

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Etude de la sénescence induite prématurément par des stress sous H2O2 chez des fibroblastes humains IMR-90 exprimant la sous unité catalytique de la télomérase

Marijsse, Jérôme

Award date:
2004

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**Etude de la sénescence induite prématurément par des stress sous H_2O_2 chez
des fibroblastes humains IMR-90 exprimant la sous unité catalytique de la
télomérase**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Jérôme MARIJSSE

Juin 2004

FACULTES
UNIVERSITAIRES
N.-D. DE LA PAIX
NAMUR

Bibliothèque



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**Etude de la sénescence induite prématurément par des stress sous H_2O_2 chez
des fibroblastes humains IMR-90 exprimant la sous unité catalytique de la
télomérase**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Jérôme MARIJSSE

Juin 2004

VZS 20044485

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 – 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 – Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Etude de la sénescence induite prématurément par des stress sous H_2O_2 chez des fibroblastes humains IMR-90 exprimant la sous unité catalytique de la télomérase

MARIJSSE Jérôme

Résumé

L'exposition des fibroblastes humains à divers types de stress subcytotoxiques entraîne l'apparition d'une sénescence cellulaire prématurée. Ce phénomène est caractérisé par l'apparition de toute une série de biomarqueurs. Parmi ceux-ci, on trouve une morphologie cellulaire typique, une activité β -galactosidase associée à la sénescence (SA β -gal), la surexpression de certains gènes utilisés comme biomarqueur caractéristique de la sénescence dont la fibronectine, l'ostéonectine, SM22 et l'apolipoprotéine J, ainsi qu'un arrêt irréversible du cycle cellulaire.

Au cours de ce mémoire, nous nous sommes particulièrement intéressés au rôle de la cyclooxygénase 2 dans un modèle de sénescence induite prématurément par un stress (SIPS) sous H_2O_2 chez les fibroblastes IMR-90 immortalisés par la sous unité catalytique de la télomérase, ainsi qu'à différentes voies de transduction du signal pouvant être impliquées dans la surexpression de la cyclooxygénase 2. Ainsi, nous sommes parvenus à montrer une activation des facteurs de transcription ATF-2 et AP1 dans notre modèle de SIPS, ainsi que de $p38^{MAPK}$.

Nous avons également étudié chez ces fibroblastes, les variations d'expression génique apparaissant dans la SIPS. Cette étude, réalisée à l'aide du damier à ADNc à basse densité «Senechips» a permis de déterminer une liste de gènes pour lesquels une expression différentielle est observée suite à un stress sous H_2O_2 .

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2004

Promoteur : O. Toussaint

Voici venu le moment de remercier toutes les personnes qui m'ont soutenu de près ou de loin, et qui m'ont accompagné durant ces quatre années.

Je remercie tout d'abord Monsieur le Professeur Remacle d'avoir mis à ma disposition les moyens nécessaires à la réalisation de ce mémoire.

Je remercie également le Professeur Olivier Toussaint et toute l'équipe des « GRAS » de m'avoir accueilli. Travailler au sein de votre équipe a été un réel plaisir et fut très enrichissant.

Un merci tout particulier à Florence pour avoir accepté de consacrer un peu de son temps à la correction de ce mémoire.

Et surtout, un **GRAND MERCI** à Stéphanie de m'avoir encadré et supporté pendant tout ce temps, et je lui souhaite d'ores et déjà une grande réussite pour son doctorat.

Je n'oublie pas non plus ceux du labo qui n'ont pas hésité à m'aider pendant mon mémoire, notamment Christelle et Valérie pour les tests colorimétriques et Edouard pour les Westerns.

Merci aussi aux autres mémorants qui m'ont accompagné. Je n'oublie pas tous les agréables moments que l'on a partagés, votre bonne humeur et sympathie ne sont pas passées inaperçues.

Un merci tout spécial à Marie, Dimitri, Thibaut, Pierre, Mamali, Vanessa B., Vanessa M., Yanick et bien d'autres sans qui ces années à Namur n'auraient certainement pas été aussi agréables et festives !

Enfin, je remercie mes parents, merci à vous pour vos bonnes pensées, votre soutien et vos encouragements au cours de ces quatre années.

Liste des abréviations utilisées

ADN	: Acide désoxyribonucléique
AP-1	: Activated Protein-1
ARN	: Acide ribonucléique
ARNm	: ARN messenger
ARNmt	: ARN mitochondrial
ARNT	: Aryl/hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
ATF2	: Activated Transcription Factor 2
ATP	: Adénosine Triphosphate
b-HLH	: basic-Helix-Loop-Helix
BMP-2	: Bone Morphogenic Protein
BSA	: Bovine Serum Albumin
°C	: Degré Centigrade
CBP	: CREB Binding Protein
cdk	: Cyclin-dependent kinase
CREB	: cAMP-Response-Element-Binding protein
cdki	: Cyclin-dependent kinase inhibitor
COX	: cyclooxygénase
cpm	: Coups par minute
CREB	: cAMP-Response Element Binding protein
Ct	: cycle seuil
CTL	: Contrôle
dNTP	: Dinucléotide Triphosphate
DTT	: Dithiothréitol
ECL	: Enhanced Chemo Luminescent
EDTA	: Ethylène Diamine Tétra Acétique
EGF	: Endothélial Growth Factor
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbant Assay
EMSA	: Electrophoretic Mobility Shift Assay
FGF	: Fibroblast Growth Factor
F.T	: Facteur de Transcription
FBS	: sérum de veau foetal
FDH	: Fibroblastes Diploïdes Humains
HB	: Hypotonic Buffer
HIF-1	: Hypoxia Inducible Factor-1
IκB	: Inhibitor kappa B
IL	: Inter Leukine
Kb	: Kilo base
MAPK	: Mitogen-Activated Protein Kinase
MEC	: Matrice Extracellulaire
MEM	: Milieu Modifié de Eagle
MKK	: Mitogen-activated protein kinase kinase
MF	: Morphotypes Mitotiques
NFκB	: Nuclear Factor kappa B
NLS	: Nuclear Localisation Sequence
Oligo	: Oligonucléotide

pb	: Paires de bases
PBS	: Phosphate Buffer Saline
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PDGF	: Platelet Derived Growth Factor
PIB	: Phosphatase Inhibitor Buffer
PIC	: Protease Inhibitor Cocktail
PMF	: Morphotypes Post-Mitotiques
PNPP	: p-Nitrophenyl Phosphate
pRb	: Protéine du Retinoblastome
PVDF	: Polyvinylidene Fluoride
ROIs	: Reactive Oxygen Intermediates)
Re	: Re-suspension Buffer
rpm	: Rotations par minute
Sa	: Saline Buffer
SA β-gal	: Senescence Associated β -galactosidase Activity
SDS	: Sodium Dodécyl Sulfate
SIPS	: Sénescence Induite Par les Stress
SP1	: Specificity Protein-1
SRF	: Serum Responsive Factor
SRE	: Serum Response Element
<i>t</i>-BHP	: <i>tert</i> -butylhydroperoxyde
TCA	: Acide trichloroacétique
TBS	: Tris Buffer Salin
Temed	: N, N, N', N'-tétraméthyl-éthylènediamine
TMB	: Tetra-Methyl Benzidine
TRIS	: Tris Hydroxy Méthyl Aminométhane
Tween	: Polyoxyéthylène sorbitan monolaurate
U	: Unité enzymatique
UV	: Ultra-Violets
μg	: 10 ⁻⁶ gramme
μl	: 10 ⁻⁶ litre
[³H]-T	: Thymidine tritiée

TABLE DES MATIERES

Première partie : Introduction

I. La sénescence répliative.....	1
II. Relation entre stress et vieillissement.....	1
III. La sénescence induite prématurément par les stress (SIPS)	2
Mécanismes intervenant dans la mise en place de la SIPS suite à un stress oxydatif.....	2
IV. Les biomarqueurs communs à la sénescence répliative et à la SIPS.....	3
IV.1 Modification de la morphologie.....	3
IV.2 Modification histochimique: l'activité β -galactosidase associée à la sénescence.....	4
IV.3 Altération du génome mitochondrial.....	4
IV.4 Le raccourcissement des télomères.....	5
IV.5. Changements au niveau de l'expression génique.....	5
IV.6 Cycle cellulaire : Arrêt du cycle en phase G1.....	6
V. Modèle cellulaire étudié.....	8
VI. La cyclooxygénase 2 (COX-2)	9
VII. Variation d'activité de liaison de différents facteurs de transcription.....	11
VIII. Expression différentielle de gènes impliqués dans la sénescence.....	12
IX. But de ce mémoire.....	13

Deuxième partie : Matériel et Méthodes

I. Culture cellulaire.....	14
II. Stress subcytotoxiques sur les fibroblastes IMR-90 hTERT et apparition des biomarqueurs associés à la sénescence.....	14
II.1. Description du stress.....	14
II.2. Détection de l'activité β -galactosidase associée à la sénescence.....	15
II.3. Estimation de la synthèse d'ADN par incorporation de thymidine tritiée.....	15
III. Dosage de l'activité de liaison à l'ADN du facteur de transcription en plaques multipuits	16
III.1. Principe.....	16

III.2. Extraction de protéines nucléaires.....	16
III.3. Dosage des protéines selon la méthode de Bradford	17
III.4. Détection de l'activité de liaison à l'ADN du facteur de transcription en plaque 96puits.....	17
IV. Western Blotting.....	18
IV.1. Principe	18
IV.2. Extraction protéique.....	18
IV.3. Préparation des échantillons et migration.....	19
IV.4. Transfert sur membrane PVDF.....	19
IV.5. Blocking et révélation.....	20
V. Extraction d'ARN total	20
VI. Real Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction.....	21
VI.1. Principe.....	21
VI.2. Retro-transcription d'échantillons d'ARN.....	21
VI.3. Real-time RT-PCR.....	22
VII. Hybridation sur damier à ADNc à basse densité.....	23
VII.1.Principe.....	23
VII.2.Rétro-transcription.....	23
VII.3.Hybridation sur damier.....	24

Troisième partie : Résultats et Discussion

I. Etude des biomarqueurs de la sénescence.....	26
I.1. Activité de la β -galactosidase associée à la sénescence.....	26
I.2. Etude de la capacité de prolifération.....	26
a) Incorporation de [3 H]-thymidine.....	26
b) Etude du niveau protéique de p21 ^{WAF-1}	27
II. Etude de la cyclooxygénase 2 (COX-2) chez les fibroblastes IMR-90 hTERT en SIPS induite sous H₂O₂.....	27
II.1. Etude de l'expression de COX-2 dans notre modèle.....	28
a) Niveau d'ARNm.....	28
b) Niveau protéique.....	28

II.2. Etude des voies de transduction du signal impliquées dans la surexpression de COX-2.....	28
a) Etude de l'activité de liaison de divers facteurs de transcription....	28
b) Etude de l'activation des facteurs de transcription AP1 et ATF-2....	30
c) Etude de p38 ^{MAPK} dans la surexpression de COX-2.....	30
III. Étude d'expression génique différentielle.....	32
III.1. Damier à ADNc.....	32
III.2. Real Time RT-PCR.....	34

Quatrième partie : Conclusion et Perspectives

Cinquième partie : Bibliographie

Introduction

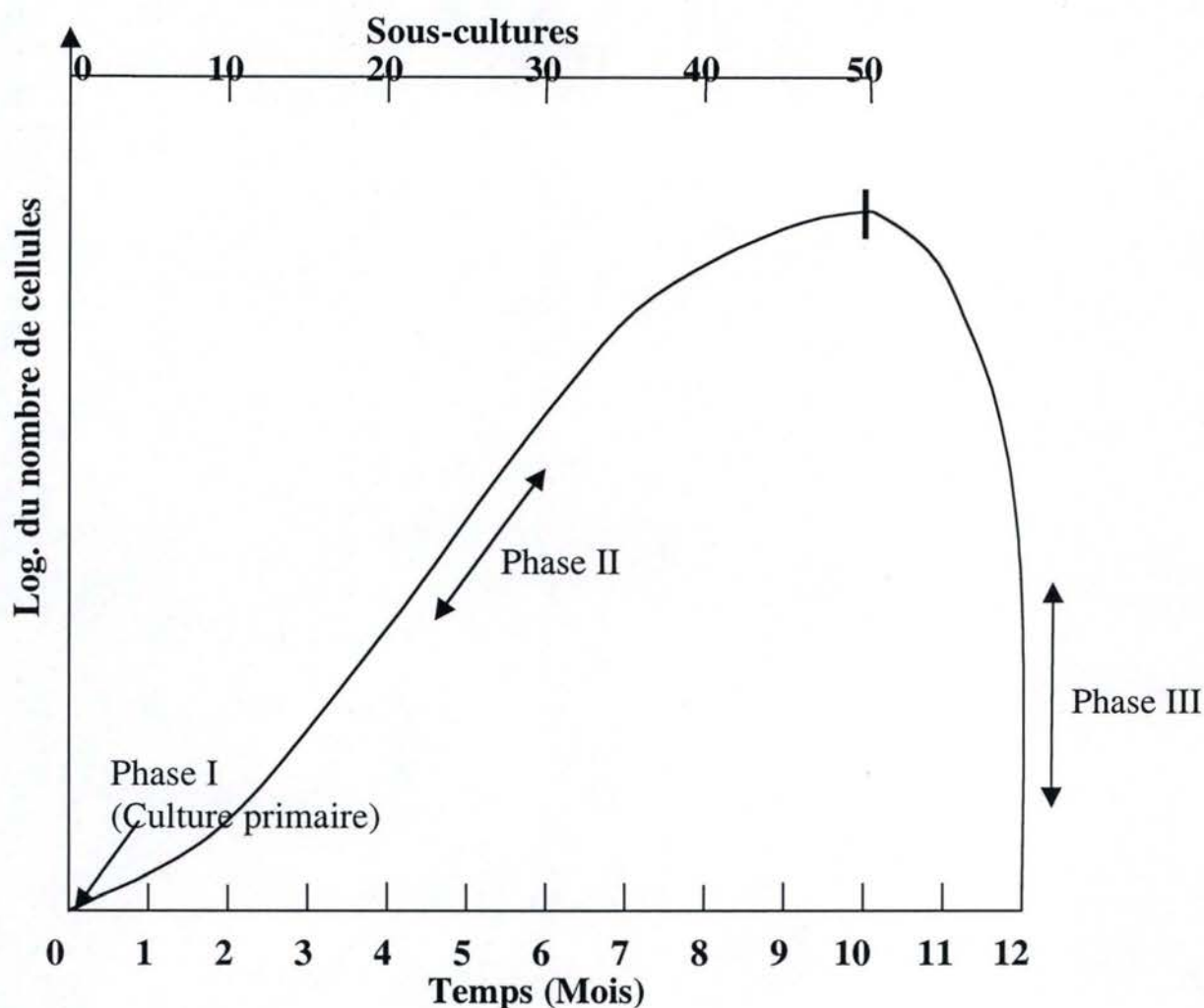


Figure I.1 : Diagramme montrant les trois phases successives d'une culture de fibroblastes normaux (Hayflick, 1977). La phase I se caractérise par la mise en culture d'un explant et l'établissement d'une culture primaire. La phase II débute dès le premier repiquage et se caractérise par un taux de croissance exponentiel. Un ralentissement du rythme de croissance survient ensuite, suivi par un arrêt définitif des divisions cellulaires. Cet état, appelé sénescence répliquative, se termine, après une période plus ou moins longue, par la mort des cellules (Phase III) (Hayflick, 1977).

I. La sénescence répllicative

En 1912, des études réalisées par Alexis Carrel suggéraient que les cellules étaient immortelles et pouvaient se diviser indéfiniment. En effet, il était parvenu à maintenir des cellules de cœur de poulet en culture pendant 35 ans, durée de vie nettement supérieure à celle d'un poulet (Carrel, 1912). Cependant aucune étude n'est jamais parvenue à reproduire cette expérience. Pour expliquer les résultats de Carrel, on proposa l'hypothèse selon laquelle le milieu de culture provenant d'embryon contenait des cellules vivantes capables de proliférer avec les autres cellules lors du changement de milieu (Hayflick, 1977).

En 1961, ces résultats furent réfutés par les expériences de Hayflick et Moorehead. Ceux-ci montrèrent que des fibroblastes de poumons fœtaux subissaient un arrêt prolifératif au bout d'une cinquantaine de passages en culture.

Ils établirent que l'évolution des cultures pouvait se diviser en 3 phases (**Figure I.1**)

- La phase I se rapporte à la mise en culture de cellules à partir du tissu d'origine.
- La phase II correspond aux divisions cellulaires se caractérisant par un taux de croissance exponentiel des cellules.
- La phase III, quant à elle, représente le ralentissement marqué des divisions cellulaires débouchant sur un arrêt irréversible des mitoses (Hayflick and Moorhead, 1961).

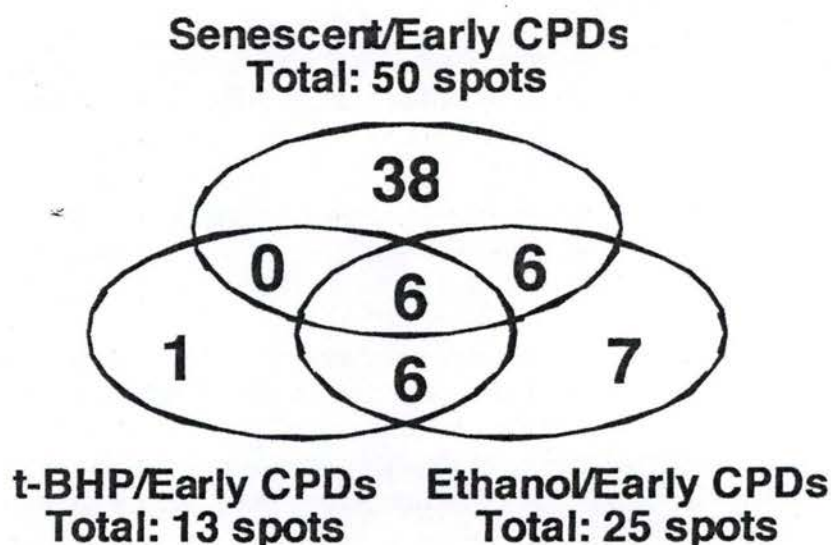
Ce modèle, connu sous le nom de sénescence répllicative, a ensuite été élargi à d'autres types cellulaires prolifératifs et à d'autres espèces animales, de telle sorte qu'il est actuellement accepté comme modèle général du vieillissement *in vitro* des cellules à potentiel prolifératif limité. D'autres études parvinrent à montrer une relation inverse entre le nombre de passages en culture d'un prélèvement tissulaire et l'âge du donneur (Martin *et al.*, 1970). Cependant, il semble que cette relation ne soit pas toujours observée. Ainsi, il arrive que des fibroblastes de centaines soient capables de proliférer aussi longtemps que des cellules issues d'individus plus jeunes (Cristofalo *et al.*, 1998 ; Tesco *et al.*, 1998). Il fut également établi que la rapidité d'un type cellulaire à entrer en sénescence pouvait dépendre de l'espérance de vie de l'espèce étudiée (Hayflick, 1970).

II. Relation entre stress et vieillissement

Un stress peut être défini comme toute perturbation d'un facteur exogène auquel un système vivant est exposé. Au cours de leur vie, les cellules sont soumises à une multitude de stress, tels que des stress osmotiques, oxydatifs, mécaniques, thermiques, etc. auxquels elles font face plus ou moins efficacement en modulant l'activité de certaines voies métaboliques. C'est ce qu'on appelle la réponse aux stress.

Dans cette réponse aux stress, on distingue d'une part la réponse immédiate, et d'autre part la réponse à long terme. La réponse immédiate détermine le sort de la cellule d'après l'activation de certaines cascades de kinases ; soit la cellule meurt par apoptose ou nécrose, soit elle survit et subit ou non des modifications. La réponse à long terme, quant à elle, correspond à des variations d'expression génique et d'activités cellulaires pouvant être observées jusqu'à plusieurs semaines après des stress d'intensité subcytotoxique.

L'intensité des stress a également son importance puisqu'elle peut déterminer le type de comportement des cellules stressées.



Phenotype	Number of spots with changed I.I	Range of change of I.I.
RS	34 spots with increased I.I +16 spots with decreased I.I =50	0.3- to 22.7-fold increase 0.3- to 9.0-fold decrease
t-BHP-induced SIPS	11 spots with increased I.I + 2 spots with decreased I.I =13	0.5- to 0.7-fold increase 0.3- and 0.6-fold decrease
ethanol-induced SIPS	18 spots with increased I.I + 7 spots with decreased I.I =25	0.3- to 0.6-fold increase 0.3- to 0.7-fold decrease

Figure I.2 : Représentation globale du nombre de différences d'intensité normalisée trouvées parmi les 1819 spots répertoriés sur les gels d'électrophorèse bidimensionnels obtenus à partir d'échantillons protéiques produits dans les conditions suivantes: FHDs sénescents (comparés aux FHDs jeunes), FHDs traités au *t*-BHP (comparés aux FHDs jeunes et aux FHDs contrôles) et FHDs traités à l'éthanol (comparés aux FHDs jeunes et aux FHDs contrôles) (Dierick *et al.*, 2002).

- Les stress de faible intensité recouvrent des stress avec des radicaux libres à faible concentration, des variations de pH ou de température etc. Ces stress n'altèrent pas directement la stabilité des systèmes cellulaires. En effet, les dégâts qui en résultent sont sans cesse réparés par la cellule ce qui implique une augmentation du métabolisme cellulaire. Cependant, si le niveau de dommages atteint un seuil critique, la cellule diminue son activité métabolique et réoptimalise ses activités en tenant compte du nombre d'erreurs plus élevé. Ce passage par des niveaux successifs d'activité métabolique plus faible représente le vieillissement normal (Toussaint *et al.*, 1999).
- Les stress d'intensité subcytotoxique ou intermédiaire correspondent à des phénomènes anormaux tels que l'inflammation, l'exposition aux UV, une production élevée de radicaux libres etc. Dans ce cas, les mécanismes de réponse aux stress sont momentanément débordés ce qui mène à une accumulation de dommages irréversibles et à une perte de la stabilité cellulaire (Toussaint *et al.*, 1992). Dans ces conditions, les cellules entrent soit en sénescence prématurée, soit en apoptose (Toussaint *et al.*, 2002).
- Les stress d'intensité supérieure sont dit toxiques pour les cellules et mènent à la mort immédiate de celles-ci.

III. La sénescence induite prématurément par les stress (SIPS)

Au cours des études sur la sénescence cellulaire, différents modèles ont été mis au point pour induire une sénescence cellulaire prématurée. Ainsi le traitement des cellules par certaines substances telles que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le *tert*-butylhydroxyperoxyde (*t*-BHP), l'éthanol, ou encore les ultraviolets (UV) permettent l'apparition d'une sénescence induite prématurément par les stress ou SIPS.

Les cellules en SIPS partagent de nombreux traits communs avec les cellules en sénescence répliquative. Cependant, il existe des différences au niveau des réponses cellulaires suivant le type de stress utilisé et permettant l'apparition de la SIPS. Ainsi, une étude protéomique portant sur les variations protéiques associées à la sénescence (étude par gel 2D) montre que sur 50 protéines dont le niveau d'expression varie en sénescence répliquative, seule 12 sont communes avec les cellules en SIPS sous éthanol et 6 avec les cellules en SIPS traitées à l' H_2O_2 (**Figure I.2**) (Dierick *et al.*, 2002).

Parmi les stress qui ont été cités, nous nous attarderons principalement sur la SIPS induite par l' H_2O_2 . Cette molécule oxydante est capable de générer des ROIs (Reactive Oxygen Intermediates) qui peuvent réagir avec la plupart des liaisons insaturées des molécules biologiques. Les conséquences de leurs actions se traduisent par une déstabilisation des membranes via les peroxydes lipidiques, une agrégation des protéines accompagnée d'une diminution des activités enzymatiques, et enfin, des dommages à l'ADN peuvent être à l'origine de modifications de nucléotides et de cassures simple ou double brin.

Mécanismes intervenant dans la mise en place de la SIPS suite à un stress oxydatif.

La voie de transduction du signal expliquant la mise en place de la SIPS suite à un stress sous H_2O_2 semble avant tout provenir des dommages à l'ADN. Trois protéines sont fortement impliquées dans les mécanismes de réponse au stress. Il s'agit de p53, p21^{Waf-1} et pRb. P53 est un facteur de transcription pouvant jouer le rôle de suppresseur de tumeurs.

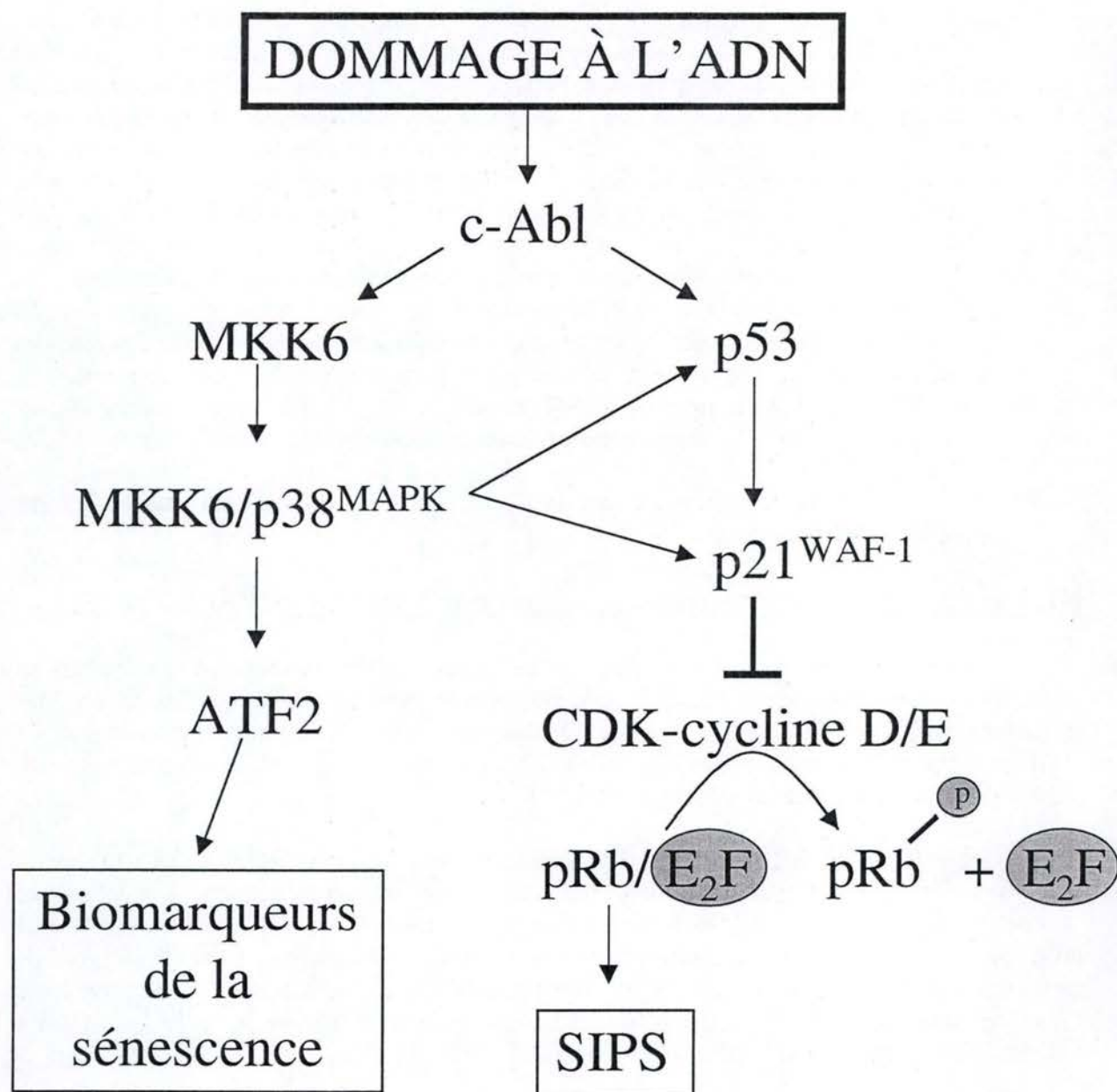


Figure I.3 : Illustration des mécanismes permettant la mise en place de la SIPS suite à un stress oxydatif.

Lorsque des cellules quiescentes sont stimulées par des mitogènes, l'activité de p53 décline brusquement avant l'entrée des cellules en phase S. Ce déclin est dû à l'induction de MDM2 en fin de phase G1, qui lie et inactive p53.

Chez les cellules en sénescence, MDM2 n'est plus induite en présence de mitogènes ce qui permet à p53 de jouer son rôle de suppresseur de tumeurs. En cas de dommages à l'ADN, p53 est activé par c-Abl. p53 peut alors se fixer à sa séquence consensus au niveau des promoteurs de gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire. Ceci empêche la liaison des facteurs de transcription, et donc, inhibe l'expression de ces gènes. D'autre part, p53 exerce son rôle de facteur de transcription en se fixant sur le promoteur de p21^{Waf-1} et en induisant sa transcription.

p21^{Waf-1} est un CDKI (inhibiteur de kinase dépendant des cyclines) capable d'inhiber l'activité kinasique des CDK (kinase dépendant des cyclines) en s'associant au complexe CDK-cycline D ou E. L'inhibition de ces kinases permet entre autres une hypophosphorylation de pRb qui est dès lors capable de séquestrer le facteur de transcription E2F nécessaire à la synthèse d'ADN, ce qui mène à un arrêt du cycle cellulaire (pour une revue : (Bartek and Lukas, 2001)).

D'autre part, il semble que c-Abl soit également capable d'activer p38^{MAPK} via l'intervention de MKK-6 (Mitogen-activated protein kinase kinase) (Cong and Goff, 1999). Une fois le complexe p38^{MAPK}/MKK6 activé, celui-ci est transloqué dans le noyau où il active certains facteurs de transcription dont ATF-2, connu pour induire l'expression de différents biomarqueurs de la sénescence sans pour autant être responsable de l'arrêt du cycle cellulaire (Frippiat *et al.*, 2002 ; Hanafusa *et al.*, 1999).

Cependant, ce schéma doit encore être amélioré afin d'expliquer l'ensemble des variations observées lors de l'entrée en SIPS d'une cellule. C'est pourquoi une étude plus approfondie des facteurs de transcription ainsi que des variations dans l'expression de certains gènes est nécessaire à la compréhension des différents mécanismes induisant l'apparition de la SIPS (**Figure I.3**).

IV. Les biomarqueurs communs à la sénescence répllicative et à la SIPS

IV.1 Modification de la morphologie

L'équipe de Bayreuther proposa de classer les fibroblastes en 7 classes morphologiquement distinctes qu'ils appelèrent morphotypes et apparaissant en différentes proportions au cours des passages en culture (Bayreuther *et al.*, 1988). Ces différents morphotypes se distinguent par la forme, la taille et le rapport surface noyau / cytoplasme des cellules.

Ceux-ci peuvent être classés en 3 catégories (**Figure I.4**) :

- Les morphotypes mitotiques (MF I, II et III) sont caractérisés par une petite taille et un taux prolifératif élevé. Ils se retrouvent principalement dans les cultures cellulaires à faible nombre de passages en culture (=jeunes).

- Les morphotypes post-mitotiques (PMF IV, V et VI) présentent une morphologie de plus en plus étalée et se retrouvent principalement dans les cultures cellulaires à nombre élevé de passages en culture (=âgées). Ces cellules ont atteint leur nombre maximum de mitoses successives et ne se divisent donc plus. Toutefois, elles restent métaboliquement actives pendant des mois, voir des années.

- Le morphotype nécrotique (PMF VII) représente la dégénérescence des PMF VI. Ce morphotype est très rarement observable.

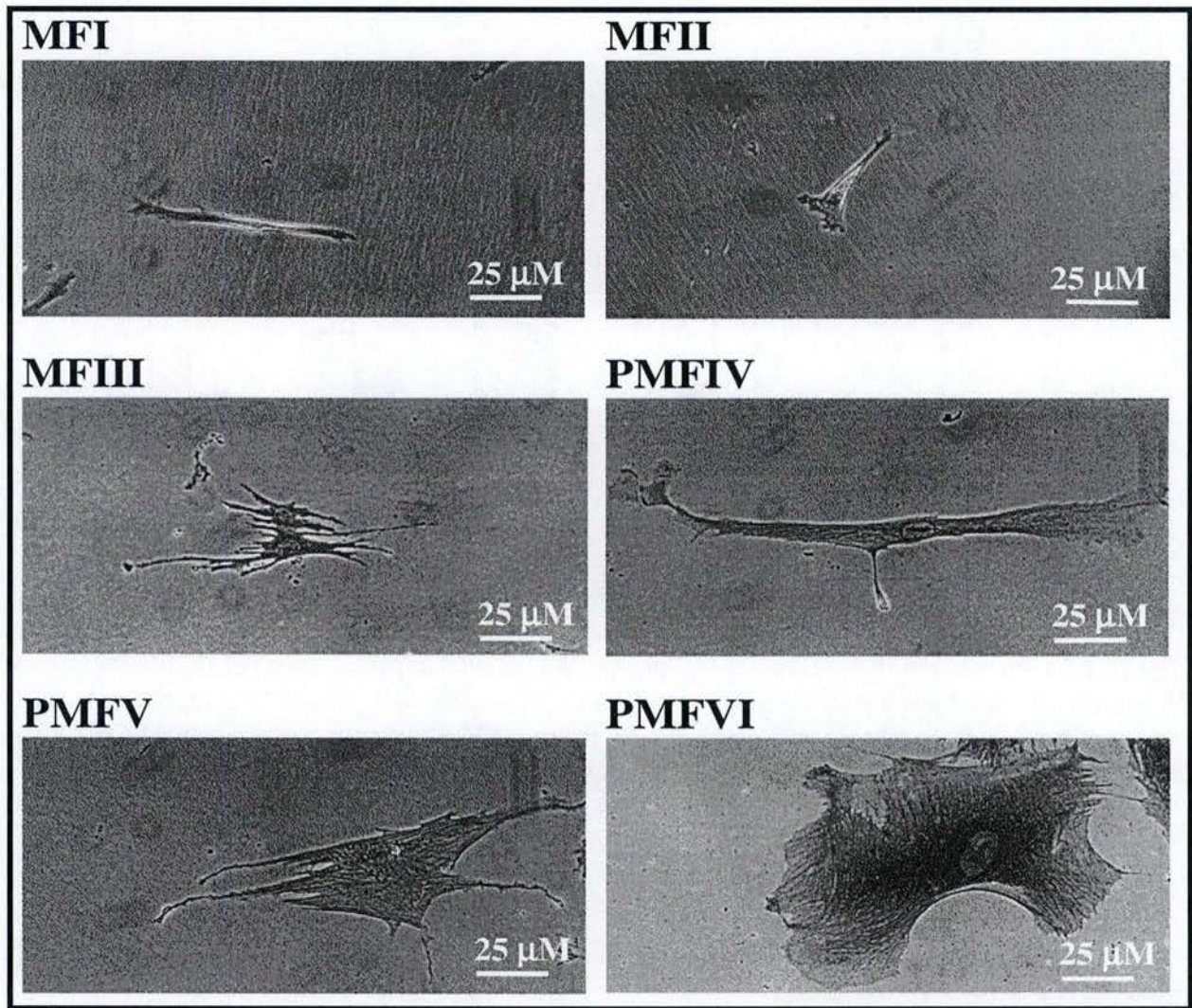


Figure I.4 : Photographies représentant les différents morphotypes tels qu'ils sont observés dans les cultures de fibroblastes humains WI-38. Les fibroblastes humains évoluent au cours de leur durée de vie proliférative à travers une séquence de sept morphotypes dont les trois premiers (MFI, MFII, MFIII) sont des cellules mitotiques et les quatre suivants (PMFIV, PMFV, PMFVI et PMFVII) des cellules post-mitotiques. Le PMFVII n'est pas représenté compte tenu de sa rareté dans des cultures de fibroblastes. Contrairement aux autres morphotypes qui sont relativement stables, le PMFVII a une durée de vie de quelques jours. Il représente le dernier stade morphologique avant la mort cellulaire (Toussaint *et al.*, 1992).

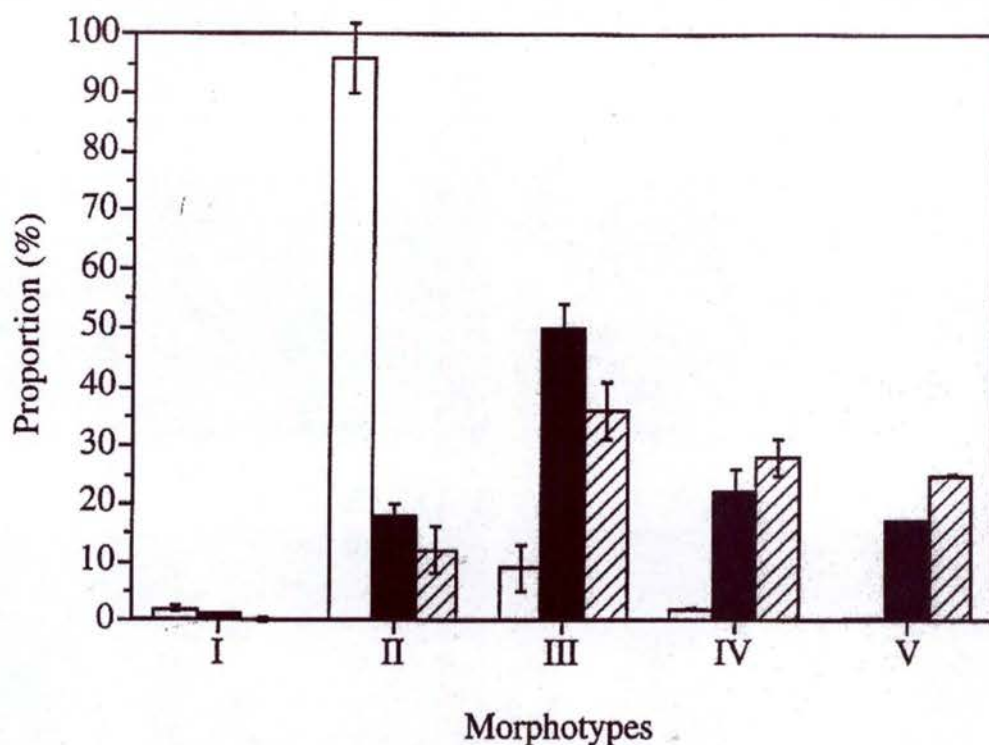
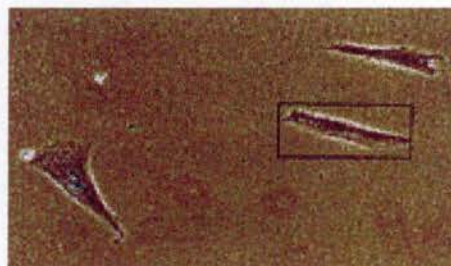
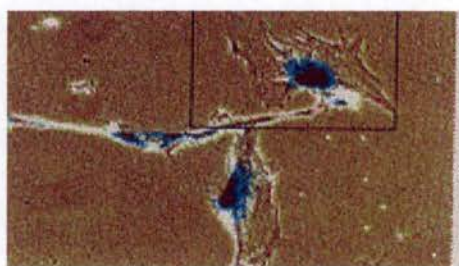


Figure I.5 : Proportion des différents morphotypes observés dans des cultures de fibroblastes WI-38 jeunes (27 DCP) représentés par les colonnes blanches, âgés (43 DCP) représentés par les colonnes noires, et de fibroblastes jeunes deux jours après avoir subi 5 stress successifs de 1h en présence de *t*-BHP 100 μ M, illustrés par les colonnes hachurées (Toussaint O. *et al.*, 1998).



Fibroblastes jeunes : morphologie de cellules jeunes où aucune activité β -galactosidase associée à la sénescence n'est détectable.



Fibroblastes sénescents : morphologie de cellules sénescents et présence d'une activité β -galactosidase associée à la sénescence.

Figure I.6 : Photographie de fibroblastes WI-38 ayant subi un traitement histochimique pour la mise en évidence de l'activité β -galactosidase associée à la sénescence (Toussaint *et al.*, 2000).

Ce critère morphologique a été utilisé afin d'analyser l'effet des stress subcytotoxiques sur le vieillissement *in vitro*. Ainsi, il fut démontré qu'une culture de fibroblastes jeunes stressée au *t*-BHP voyait sa population de morphotypes jeunes diminuer au profit d'une augmentation de morphotypes âgés dans les 72 heures après stress (**Figure I.5**) (Toussaint *et al.*, 1992)

IV.2 Modification histochimique : l'activité β -galactosidase associée à la sénescence

La β -galactosidase est une hydrolase lysosomale. En 1995, l'équipe de J. Campisi a mis en évidence chez les cellules sénescents, une activité β -galactosidase qui leur est propre et pour cette raison nommée « Senescence Associated β -galactosidase Activity » (SA β -gal). L'activité de cette enzyme est détectable dans les cellules sénescents par histochimie à pH 6 grâce au X-GAL, un substrat artificiel de l'enzyme, qui après clivage colore les cellules en bleu (Dimri *et al.*, 1995). Il est essentiel que la révélation de cette activité ait lieu à pH 6 car il existe une activité β -galactosidase détectable à un pH optimal de 4 à la fois chez les cellules jeunes et âgées. De plus, il semble que ce biomarqueur soit relativement ubiquiste. En effet, diverses études ont permis de le mettre en évidence chez plusieurs types cellulaires humains dont les fibroblastes, les kératinocytes ou encore les cellules épithéliales mammaires (Dimri *et al.*, 1995) (**Figure I.6**).

Il a été montré que cette activité apparaît suite à un élargissement du pic de pH optimal qui serait dû à l'augmentation de la taille des lysosomes chez les cellules sénescents, permettant ainsi une accumulation de l'enzyme dont l'activité devient détectable dans une gamme de pH plus élargie (Kurz *et al.*, 2000). Quoiqu'il en soit, ce biomarqueur représente un outil très facile à mettre en œuvre pour la détection des cellules sénescents au sein d'une culture cellulaire.

IV.3 Altération du génome mitochondrial

L'énergie, sous forme d'ATP, nécessaire au métabolisme cellulaire provient essentiellement des mitochondries. Les mitochondries possèdent un génome circulaire de 16569 pb codant en partie pour les protéines impliquées dans la respiration mitochondriale et dans sa réplication. Au cours du vieillissement cellulaire, de nombreuses mutations et délétions dans ce génome ont été observées. Parmi celles-ci on retrouve celles touchant à la chaîne de transport des électrons ainsi que celles portant sur des gènes impliqués dans la réplication mitochondriale (Lezza *et al.*, 1994 ; Michikawa *et al.*, 1999). La plus fréquente étant une délétion de 4977 pb dite « délétion commune » de l'ADN mitochondrial que l'on retrouve aussi bien en sénescence répllicative et en SIPS (Dumont *et al.*, 2000).

Ces délétions méritent une attention toute particulière. En effet, toute altération au niveau de la chaîne de transport d'électrons peut provoquer l'apparition de radicaux libres, capables de causer de nombreux dommages cellulaires, et participer ainsi à la sénescence.

Le mécanisme faisant apparaître ces délétions dans le génome mitochondrial n'est pas connu, cependant, il existe une corrélation entre l'exposition de l'ARNmt à des stress oxydatifs et leurs apparitions

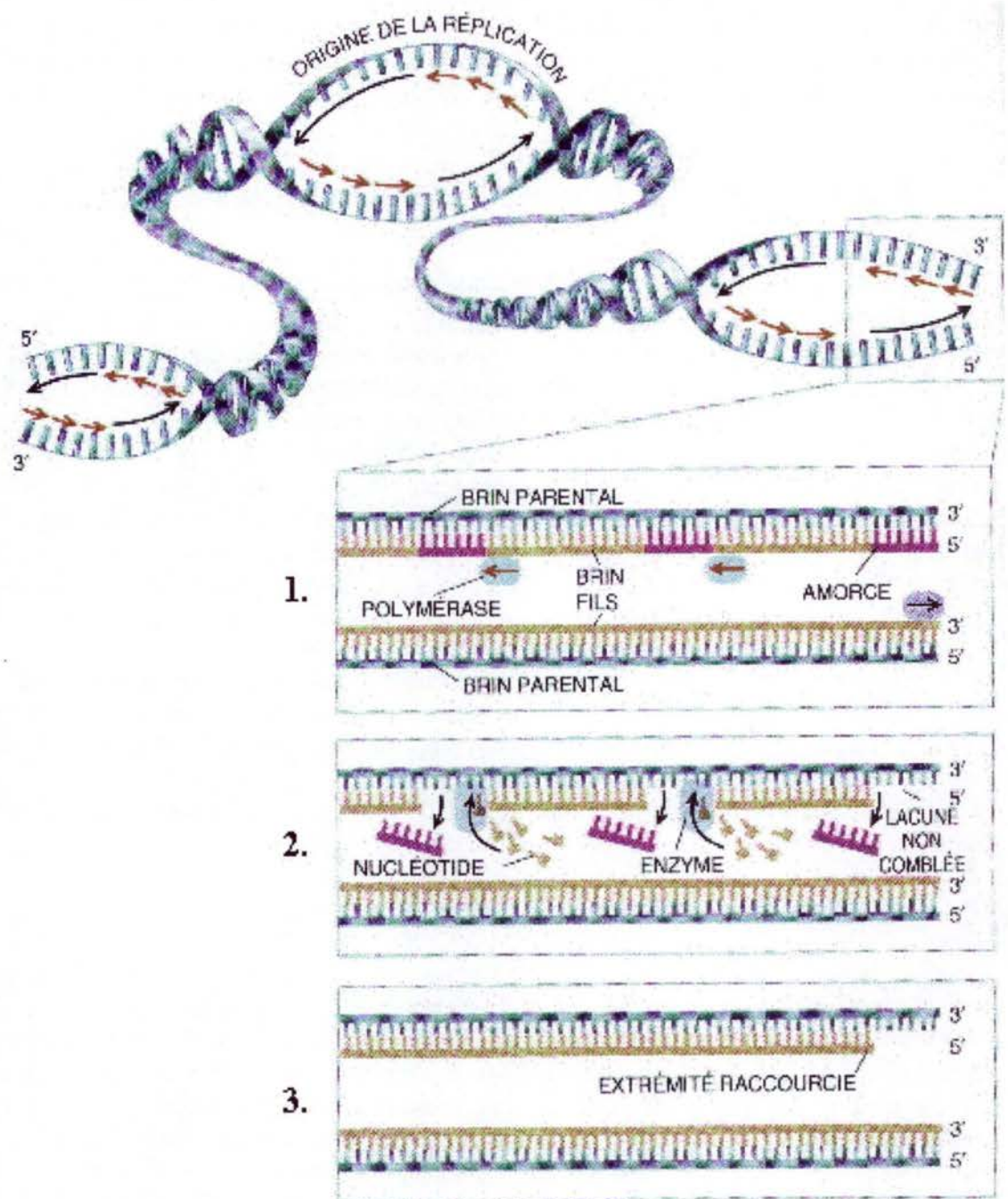


Figure I.7 : Explication du raccourcissement des télomères lors de la réplication. Durant celle-ci, l'un des deux brins est répliqué de façon discontinue. Les fragments d'Okazaki (en mauve) s'hybrident au brin matrice et servent d'amorce à la polymérase. Une fois que le morceau d'ADN a été répliqué, les fragments d'Okazaki (ARN) sont dégradés et sont remplacés par de l'ADN. Cependant, ce remplacement ne se fait pas à l'extrémité du brin, on obtient donc un bout protrudant.

IV.4 Le raccourcissement des télomères

Les télomères constituent les extrémités des chromosomes. Chez l'homme, il y en a donc un à chaque extrémité de nos 46 chromosomes. Les télomères sont caractérisés par la répétition, un très grand nombre de fois, d'une séquence spécifique. Chez les vertébrés, cette séquence est TTAGGG (Meyne *et al.*, 1989). De nombreuses protéines sont associées aux télomères et font partie intégrante de leurs structures. Trois de ces protéines ont été identifiées chez les mammifères, il s'agit de TRF1 (Chong *et al.*, 1995), TRF2 (Broccoli *et al.*, 1992) et A1/UP1 (Dallaire *et al.*, 2000). L'ensemble de l'ADN télomérique avec ces protéines associées forme une structure nommée télosome.

Les télomères sont des éléments génétiques essentiels pour la stabilité des chromosomes (Gilson *et al.*, 1993). Ils empêchent la dégradation des extrémités chromosomiques, préviennent les recombinaisons illégitimes et empêchent les fusions entre chromosomes. En effet, les chromosomes dont les extrémités sont cassées deviennent instables et risquent de fusionner, donnant naissance à des chromosomes en anneau ou dicentriques (pour une revue : (Blackburn, 1991)). Les télomères permettent de différencier les extrémités des chromosomes de cassures doubles brins et protègent celles-ci de la dégradation par les exonucléases (Bourgain and Katinka, 1991).

À la naissance, les télomères ont une longueur d'environ 10 à 15 kb, qui diminue au cours des divisions cellulaires chez les cellules somatiques humaines. Ces pertes se chiffrent aux environs de 50 à 150 pb par passage en culture *in vitro* (Harley *et al.*, 1990; Vaziri *et al.*, 1994), et de 15 à 50 pb par an *in vivo* (Allsopp *et al.*, 1992). Ce raccourcissement est expliqué par la manière dont la polymérase synthétise les nouveaux brins complémentaires à l'ADN. En effet, alors que l'un des brins est synthétisé de façon continue, l'autre nécessite l'apparition régulière des fragments d'Okazaki. Après avoir transcrit ce brin, les fragments d'Okazaki sont alors dégradés et la polymérase utilisant de l'ADN nouvellement synthétisé comme amorce, les remplace par de l'ADN. Cependant la polymérase est incapable de remplacer le fragment se trouvant à l'extrémité chromosomique puisqu'il n'y a pas d'amorce pour initier cette synthèse (**Figure I.7**).

À partir de cette observation est née la théorie télomérique du vieillissement cellulaire. Selon celle-ci, le raccourcissement critique d'au moins un télomère peut induire un arrêt du cycle cellulaire (Allsopp *et al.*, 1992). Différents modèles ont été proposés afin d'expliquer par quel mécanisme le raccourcissement des télomères pourrait induire la sénescence répllicative. Parmi ceux-ci, le modèle le plus souvent accepté est celui où le raccourcissement télomérique serait perçu par la cellule comme un dommage à l'ADN, ce qui induirait une réponse d'arrêt de prolifération en phase G1 du cycle cellulaire. En effet, la génération de cassures simples ou doubles brins conduit à l'activation de c-Abl qui induirait l'activation de p53. Cette activation induit p21^{Waf-1} et d'autres inhibiteurs de cyclines/CDK ce qui mène à un arrêt du cycle cellulaire (Saretzki *et al.*, 1999).

IV.5. Changements au niveau de l'expression génique

Des études sur des FDHs (Fibroblastes Diploïdes Humains) ont permis de déterminer 80 gènes dont le niveau d'expression génique varie au cours du vieillissement *in vitro*. Il s'agit pour la plupart de gènes codant pour des facteurs de croissance, des récepteurs, des composants de la matrice extracellulaire (MEC), des régulateurs du cycle cellulaire, etc. (pour une revue : (Cristofalo *et al.*, 1998)).

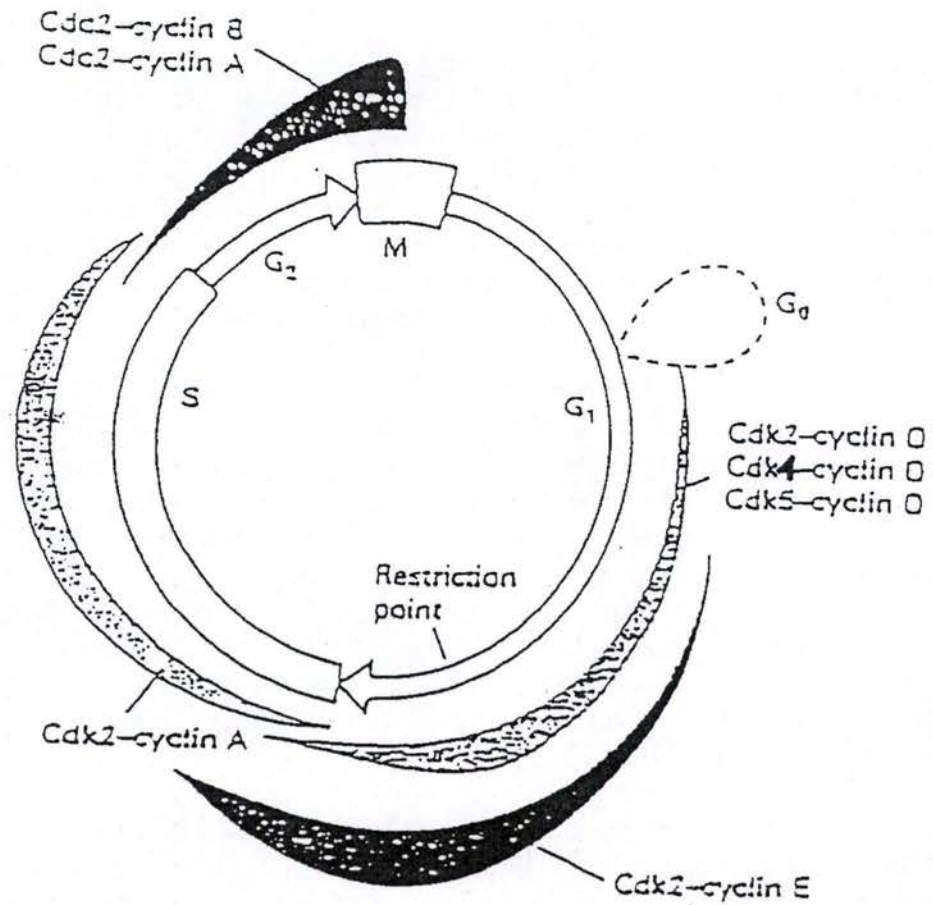


Figure I.8 : Représentation schématique de l'intervention des différents complexes cycline / CDKs au cours du cycle cellulaire.

Parmi ces gènes, 5 d'entre eux sont couramment utilisés comme biomarqueurs de la sénescence. Ceux-ci sont l'ostéonectine, la fibronectine, SM22, l'apolipoprotéine J et l' α 1-procollagène de type II (Gonos *et al.*, 1998).

La fibronectine et l' α 1-procollagène de type II sont des composants essentiels de la MEC associés à des fonctions telles que l'adhésion cellulaire, l'organisation du cytosquelette, la migration, la croissance et la différenciation cellulaire. La fibronectine interviendrait entre autres dans les changements morphologiques observés lors de la sénescence répliquative et de la SIPS.

L'ostéonectine contribue au remodelage des tissus en induisant l'expression de métalloprotéases telles que la collagénase et la gélatinase capable de dégrader la MEC et les membranes basales. D'autre part, il a été démontré que l'ostéonectine était capable d'inhiber l'entrée en phase S de certains types cellulaires. En effet, cette protéine peut se fixer au PDGF (platelet derived growth factor) empêchant ainsi la reconnaissance de ce dernier par son récepteur spécifique (Pichler *et al.*, 1996).

L'apolipoprotéine J est une chaperonne sécrétée impliquée dans de nombreux processus biologiques tel que l'embryogenèse et la différenciation cellulaire (French *et al.*, 1993; Zakeri *et al.*, 1992). Cette protéine semble protéger les cellules lors de stress oxydatifs en empêchant l'altération radicalaire de certaines protéines (Dumont *et al.*, 2002).

SM22, quant à elle, est une protéine du cytosquelette de 22 KDa abondante dans les cellules musculaires lisses. Celle-ci serait capable de se lier aux fibres de stress ainsi qu'à la fibronectine et interviendrait donc dans l'organisation du cytosquelette (Lees-Miller *et al.*, 1987).

IV.6 Cycle cellulaire : Arrêt du cycle en phase G1

Le cycle cellulaire est subdivisé en 4 phases :

- La phase G1 qui est une phase de croissance et de récupération.
- La phase S correspondant à la duplication du génome.
- La phase G2 où se met en place les mécanismes pour la division cellulaire.
- La phase M correspondant à la mitose et à la division cellulaire.

En fin de la phase G1, la cellule passe par un point de restriction R, lui permettant de déterminer si toutes les conditions sont remplies pour entamer une nouvelle division (abondance de milieu nutritif, importance des dommages à l'ADN, etc).

La progression du cycle cellulaire à travers ces différentes phases est régulée par une famille de protéines kinases appelées CDK formant des complexes avec diverses cyclines (**Figure I.8**).

Les complexes cycline D/CDK4,6 sont activés suite à une stimulation par un mitogène et permettent l'entrée en phase S. Parmi les substrats de ces complexes, on trouve la protéine du retinoblastome (pRb) qui une fois phosphorylée permet la libération de facteurs de transcription dont E2F permettant l'expression de gènes importants pour la phase S.

Les complexes cycline E/CDK2 ont une activité importante lors de la transition G1/S, ils sont indispensables pour la mise en route de la synthèse d'ADN. La cycline A remplace ensuite la cycline E qui s'est rapidement fait dégrader dès le début de la phase S.

Les complexes cycline A/CDK2 semblent nécessaires à la réplication de l'ADN. Les substrats de ces complexes sont encore mal connus, cependant ils peuvent se lier à E2F pour inhiber son activité de facteur de transcription (French M. 1996)

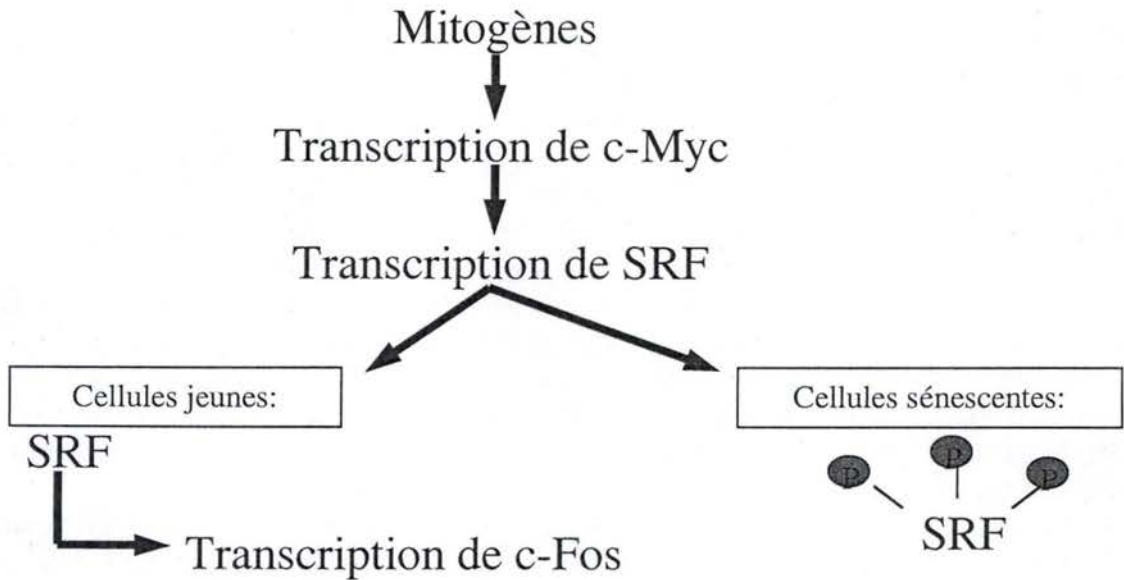


Figure I.9: vue générale de la cascade du signal permettant la transcription de c-Fos

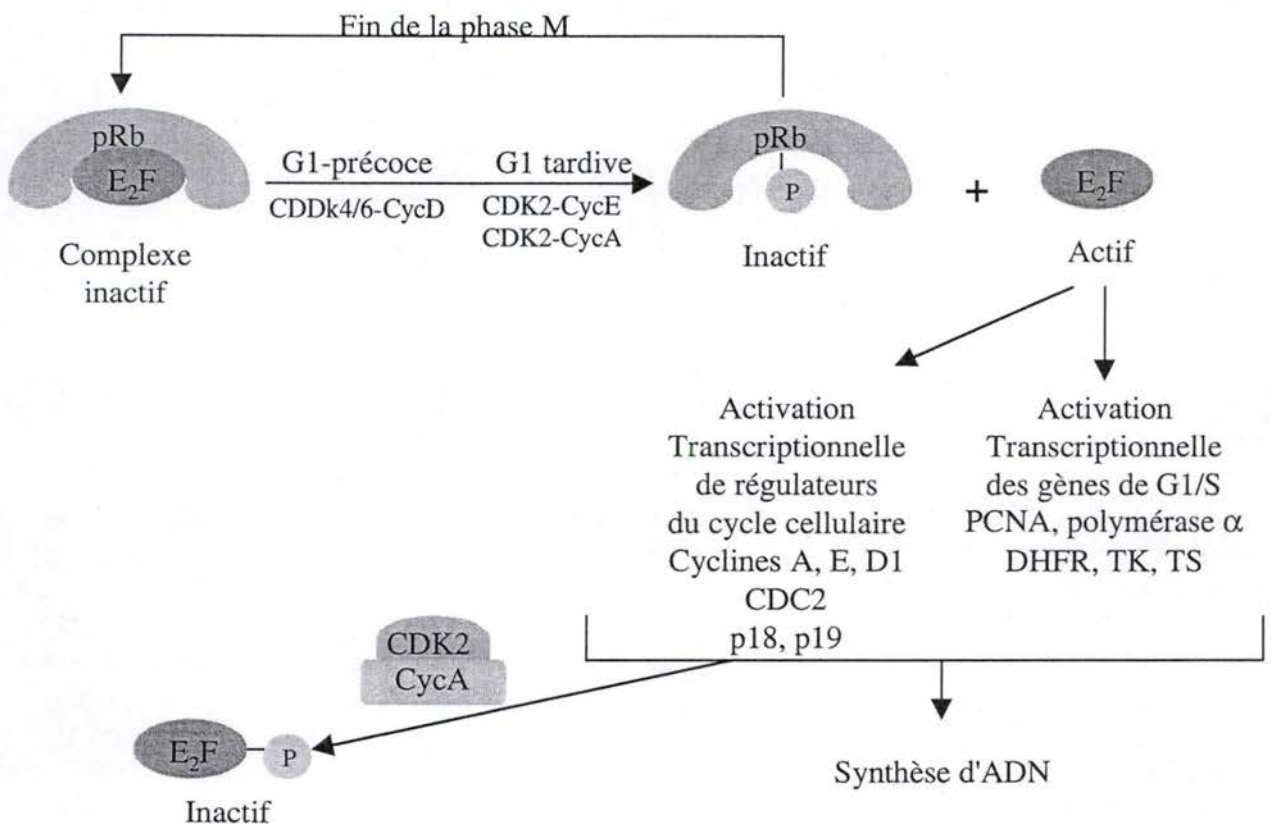


Figure I.10 : Rôle de pRb dans la régulation du cycle cellulaire. La phosphorylation de pRb dès la phase G1 est assurée par différents complexes cyclines-CDK et conduit à la libération du facteur de transcription E₂F. Dès lors actif, E₂F active la transcription de nombreux gènes dont les produits sont impliqués dans la réplication de l'ADN ou la régulation du cycle cellulaire. E₂F active, entre autres, la synthèse de la cycline A. Le complexe CDK2-CycA, actif en phase S, inactive E₂F par phosphorylation.

On a observé, chez les cellules entrant en sénescence, une incapacité de prolifération et surtout de synthèse d'ADN. En effet, celles-ci sont pour la plupart incapable de passer outre le point de restriction R et sont donc bloquées en fin de phase G1. Plusieurs gènes sont impliqués dans cet arrêt prolifératif, on peut classer ces gènes en 4 catégories (pour une revue : (Campisi J., 1996)) :

➤ **Les gènes de réponse immédiate (early G1).**

Ces gènes sont induits rapidement après une stimulation par des mitogènes ou par des facteurs de croissance pour permettre la prolifération.

La plupart des gènes requis pour le début de la phase G1 se retrouvent normalement exprimés chez les cellules sénescents. Cependant, au moins trois d'entre eux ne sont plus exprimés suite à une stimulation par de mitogènes. Il s'agit des gènes c-fos, Id1 et Id2.

c-Fos est un proto-oncogène codant pour une sous-unité du facteur de transcription AP-1. Chez les cellules jeunes, les mitogènes induisent des voies de transduction du signal qui finissent par activer le gène c-Myc. c-Myc permet ensuite l'expression d'une protéine SRF (Serum Responsive Factor) capable de se lier à sa séquence consensus SRE (Serum Response Element) permettant la transcription de c-Fos (Atadja *et al.*, 1994).

Chez les cellules sénescents, SRF devient hyperphosphorylé et n'est plus capable de se fixer à SRE (**Figure I.9**).

Les gènes Id1 et Id2 sont, quant à eux, des facteurs de transcription de type bHLH (basic Helix-Loop-Helix), dont on ignore actuellement le rôle ainsi que la cause de leurs répressions.

➤ **Les gènes de la phase G1/S**

Cette répression de gènes normalement exprimés lors de la transition G1/S semble être induite par une déficience du facteur de transcription E₂F. Ces gènes codent pour des enzymes nécessaires à la synthèse d'ADN, il s'agit entre autres de la dihydrofolate réductase, la thymidine kinase, la thymidine synthétase et la thymidilate synthétase. La déficience en E₂F est due à une hypophosphorylation de la protéine pRb (protéine du rétinoblastome) qui, après s'y être liée, permet sa dégradation. En temps normal, la protéine pRb est phosphorylé par des complexes cyclines/CDK, ce qui permet la libération du facteur E₂F (**Figure I.10**).

➤ **Les cyclines et CDK**

On observe chez les cellules sénescents une altération dans l'expression et l'activité de certains complexes cyclines-CDK (**Figure I.11**).

- Les cyclines D1 et E sont surexprimées à un niveau 10 à 15 fois supérieur à la normale.
- Les complexes cyclines D-CDK4,6 montrent une diminution dans leur activité malgré leur présence à une concentration normale dans les cellules.
- Les complexes composés de CDK2 (cycline D1-CDK2 et cycline E-CDK2) présentent également une diminution de leur activité malgré la présence de ses constituants à un taux normal. Cette absence de phosphorylation est attribuée à des défauts de phosphorylation.
- Les cyclines A et B sont également réprimées dans les cellules sénescents. La répression de la cycline A est notamment due à l'hypophosphorylation de pRb.

CDK	Poids moléculaire (kDa)	Sous-unité régulatrice	Inhibiteur	Fonctions cellulaires principales
CDK1	34	Cycline B Cycline A	p21 ^{Waf-1} p27 ^{kip-1}	Déclenchement de la mitose
CDK2	33	Cycline A Cycline E	p21 ^{Waf-1} p27 ^{kip-1}	Régulation de la réplication de l'ADN (via pRb?) Phosphorylation de pRb
CDK3	36	?		Régulation de la phase G ₁
CDK4	34	Cycline D	p21 ^{Waf-1} , p27 ^{kip-1} , p15 ^{INK-5B} _{4A} , p16 ^{INK-}	Phosphorylation de pRb
CDK5	35	Cycline D?	p21 ^{Waf-1}	Participation au métabolisme
CDK6	40	Cycline D	p15 ^{INK-5B} _{4A} , p16 ^{INK-} , p18 ^{INK-4C}	Phosphorylation de pRb
CDK7	42	Cycline H	?	Activation des autres kinases

Figure I.11: Propriétés des principales CDKs et leurs rôles cellulaires (d'après Wolowiec, D. and French, M., 1996).

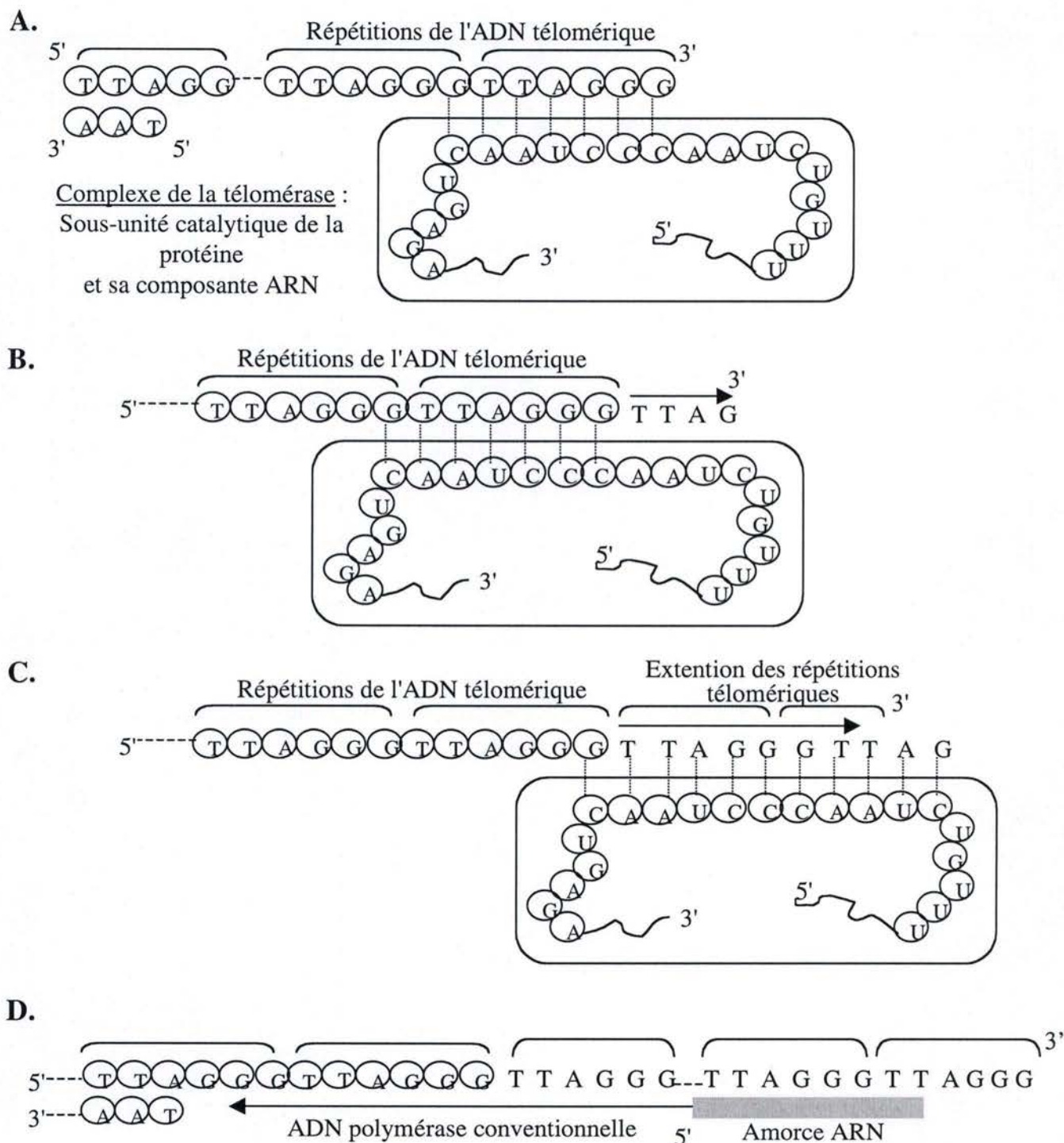


Figure I.12 : Modèle d'élongation des extrémités chromosomiques par la télomérase (Urquidí *et al.*, 2000). (A) La télomérase s'hybride au télomère via l'extrémité 3' de son ARN au niveau de la structure simple-brin la plus distale. (B) La télomérase catalyse l'extension du brin télomérique riche en G sur toute la longueur de sa molécule d'ARN. (C) L'enzyme se déplace vers l'extrémité et catalyse une nouvelle élongation. Ce processus se répète plusieurs fois résultant en une élongation dans le sens 5' vers 3'. (D) Le brin complémentaire (riche en C) est synthétisé par extension d'une amorce ARN par une ADN polymérase conventionnelle.

➤ Les inhibiteurs de complexes cyclines-CDK

Les complexes cyclines-CDK sont régulés négativement par des protéines appelées CDKI (inhibiteur de kinases dépendantes de cyclines). Ces inhibiteurs peuvent être classés en deux familles : La famille INK4 et la famille de $p21^{waf-1}$.

La famille INK4

Cette famille comprend 4 protéines capables de se lier et d'inactiver les protéines CDK4 et CDK6. Ces protéines exercent leurs actions inhibitrices, soit en dissociant les complexes cycline D-CDK4 et cycline D-CDK6 déjà formés, soit en empêchant la liaison de la cycline correspondante.

La protéine $p16^{INK-4a}$ notamment, est surexprimée chez les cellules sénescents. Cette dernière inhibe l'association des cyclines D avec CDK4 et CDK6 et empêche par conséquent la phosphorylation de pRB. Les cellules sont donc bloquées en phase G1 (Serrano *et al.*, 1997).

La famille de $p21^{waf}$

Cette seconde famille constituée de $p21^{Waf-1}$, $p27^{Kip1}$ et $p57^{Kip2}$, peut inhiber tous les complexes cyclines-CDK présents en phase G1.

La plus intéressante de ces protéines est très certainement $p21^{Waf-1}$. En effet, celle-ci est activée transcriptionnellement par p53 suite à une accumulation de dommages à l'ADN. Une fois activée, $p21^{Waf-1}$ empêche l'activité kinasique de nombreux complexes de la phase G1 tel que les complexes impliqués dans la synthèse d'ADN (CDK 2 et 4 / cycline D et E).

On observe chez les cellules sénescents, une augmentation de la quantité d'ARNm de $p21^{Waf-1}$ qui devient 10 à 20 fois supérieure par rapport aux cellules jeunes.

Le pic de surexpression de $p21^{Waf-1}$ apparaît avant l'entrée en sénescence, puis une fois celle-ci installée, son niveau d'expression diminue progressivement alors que celui de $p16^{INK-4a}$ augmente.

V. Modèle cellulaire étudié

Au cours de ce mémoire nous avons travaillé avec des fibroblastes de poumons fœtaux IMR-90 immortalisés par la sous-unité catalytique de la télomérase humaine, hTERT. La télomérase est une ribonucléoprotéine possédant une activité transcriptase inverse et composée d'une sous unité catalytique et d'une amorce d'ARN (Morin, 1989). L'ARN de la télomérase contient un motif de 9 à 30 nucléotides (Greider, 1996). Il est complémentaire de l'ADN chromosomique et fonctionne comme amorce pour l'extension de l'extrémité 3' sortant du télomère (Greider and Blackburn, 1989; Yu *et al.*, 1990). Une fois cette extrémité 3' allongée, une nouvelle amorce peut s'hybrider et permettre la synthèse du brin complémentaire (**Figure I.12**).

L'expression de la sous-unité catalytique hTERT dans les fibroblastes humains, qui en sont habituellement dépourvus, instaure une activité télomérase, permettant ainsi de maintenir constante la taille des télomères. Ces fibroblastes voient alors leur durée de vie proliférative allongée. Ils peuvent être maintenus en culture pendant au moins 300 passages en culture (Bodnar *et al.*, 1998). Ces observations permettent de conclure que l'expression ectopique de la télomérase dans des fibroblastes prévient la sénescence. De plus, ces cellules semblent indiscernables des cellules somatiques jeunes et ne montrent aucun signe d'anomalies chromosomiques (Jiang *et al.*, 1999), ni d'aberration des points de contrôle du cycle cellulaire

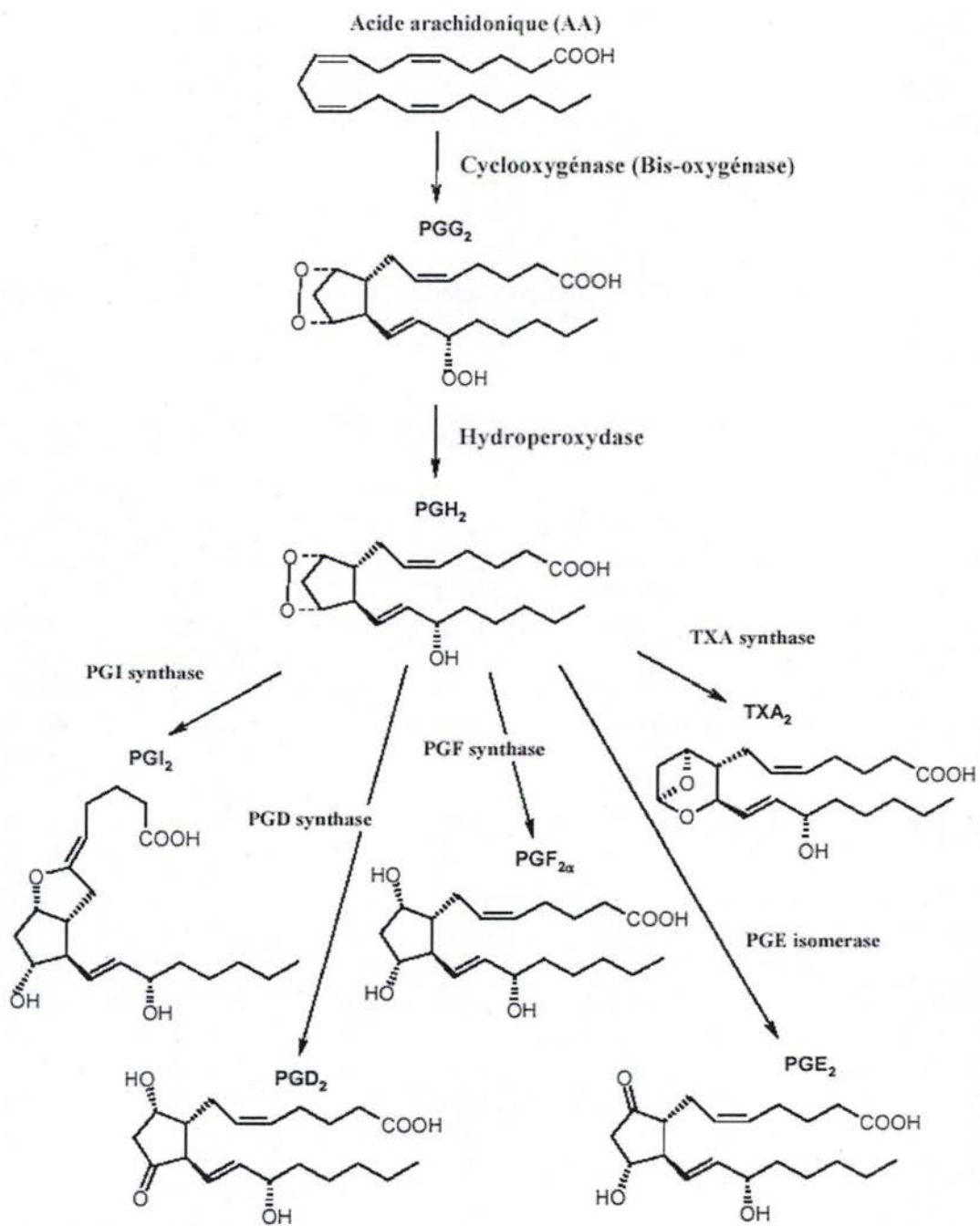


Figure I.13: Voie de la cyclooxygénase

(pour une revue : (Holt and Shay, 1999)). Toutefois, une étude comparative de profils d'expression génique a montré que les fibroblastes BJ immortalisés par la télomérase sont différents des fibroblastes BJ normaux. Au cours de cette étude, C. Lindvall a mis en évidence une augmentation importante de l'expression de l'épiréguline. La surexpression de ce facteur de croissance, issu de la famille de l'EGF (epidermal growth factor) pourrait augmenter le risque de développer le phénotype transformé chez les fibroblastes BJ hTERT (Lindvall *et al.*, 2003).

En 2002, Gorbunova et son équipe ont montré que la restauration de l'activité télomérase chez des fibroblastes conférait à ces cellules une résistance accrue face aux stress cytotoxiques induisant l'apoptose. Toutefois, cette enzyme n'empêchait pas l'apparition de la SIPS suite à une exposition aux UV ou à l'H₂O₂. En effet, les fibroblastes surexprimant hTERT présentaient une activité SA β -gal ainsi qu'un arrêt prolifératif en fin de phase G1 caractérisant les cellules en SIPS. Ces observations indiquent donc que, contrairement à la sénescence répllicative, la SIPS ne peut être empêchée par un maintien de la longueur des télomères via hTERT (Gorbunova *et al.*, 2002).

D'autres études réalisées par Gorbunova ont montré l'importance du type de promoteur régulant l'expression de la sous-unité hTERT. En effet, lorsque la sous-unité hTERT est sous le contrôle d'un promoteur fort, la cellule voit son activité télomérique augmenter. Chez cette population, on peut observer des cellules en sénescence. Par contre quand la sous-unité catalytique de la télomérase est régulée par un promoteur faible, les cellules sont bien immortalisées (Gorbunova *et al.*, 2002). Etant donné que les IMR-90 avec lesquelles nous travaillons ont été transfectées avec un plasmide présentant un promoteur faible pour la sous unité catalytique de la télomérase, aucune cellule sénescence ne devrait être détectée dans notre population de départ.

J.P. de Magalhaes a également mis en évidence l'apparition des biomarqueurs associés à la sénescence après avoir soumis des fibroblastes hTERT de souche BJ à des stress à l' H₂O₂ ou aux UV-B induisant la SIPS (de Magalhaes *et al.*, 2002). Le nombre de cellules positives pour l'activité SA β -galactosidase augmente dans les mêmes proportions chez les cellules hTERT que chez les cellules normales. Les cellules BJ hTERT montrent une morphologie de type sénescence ainsi qu'une capacité de prolifération fortement diminuée. Ces résultats indiquent que les cellules hTERT de souche BJ sont donc capables d'entrer en SIPS .

Lors de ce travail, nous avons étudié l'induction de la SIPS par un stress à l' H₂O₂ chez des fibroblastes IMR-90 transfectés avec la sous unité catalytique hTERT de la télomérase. Différents biomarqueurs de la sénescence ont été étudiés suite à un stress unique sous H₂O₂ à des concentrations et durées différentes. Il s'est avéré qu'un stress de 2 heures sous une concentration en H₂O₂ de 200 μ M représentait la condition optimale pour l'entrée des cellules en SIPS et n'impliquait pas de mortalité. Ce résultat fut vérifié par un test de cytotoxicité via un dosage protéique au folin, un test de l'activité SA β -galactosidase, une estimation du potentiel prolifératif par mesure de l'incorporation de thymidine tritiée et une estimation du niveau d'expression de la protéine p21^{Waf-1}.

VI. La cyclooxygénase 2 (COX-2)

L'activité cyclooxygénase (COX) ou prostaglandine G/H synthase (Copeland *et al.*, 1994) a un rôle essentiel dans la cascade de l'acide arachidonique (**Figure I-13**). En effet, cette enzyme bifonctionnelle est capable dans un premier temps de convertir l'acide

arachidonique en endoperoxyde cyclique (PGG₂) (fonction cyclooxygénase). Ensuite, ce premier produit est transformé en PGH₂ par la fonction peroxydase de l'enzyme (De Witt, 1991). La PGH₂, quant à elle, sert de précurseur pour la synthèse de divers médiateurs chimiques que sont les prostanoïdes et les thromboxanes. Ces métabolites sont impliqués dans la transmission des informations entre les cellules et notamment ils sont à l'origine des processus inflammatoires.

A ce jour, deux isoformes de la cyclooxygénase ont été identifiées: la COX-1, une enzyme constitutive et la COX-2, une enzyme inducible.

Le gène de la COX-1 est localisé sur le chromosome 9 et code pour une protéine de 67 kDa composée de 576 acides aminés. Cette glycoprotéine fixée à la membrane du réticulum endoplasmique et de l'enveloppe nucléaire est responsable de la production physiologique de prostanoïdes intervenant dans les processus d'aggrégation plaquettaire et dans l'homéostasie du tractus gastrointestinal et du rein (Spencer *et al.*, 1998).

La COX-2, quant à elle, a été découverte en 1990 et a été rapidement associée aux phénomènes inflammatoires pouvant toucher l'organisme. Elle a été mise en évidence après que certaines études aient prouvé que la quantité de protéines COX augmentait dans les états inflammatoires, suggérant la présence d'une forme inducible de la cyclooxygénase (Raz *et al.*, 1988). La COX-2 est exprimée lors de stimuli inflammatoires dans un nombre limité de types cellulaires comme les monocytes-macrophages, les cellules endothéliales et les fibroblastes. Ces stimuli sont des cytokines pro-inflammatoires (Interleukine-1 β , Tumor Necrosis Factor- α), des lipopolysaccharides, les mitogènes et oncogènes, des facteurs de croissance (FGF, PDGF, EGF) ainsi que des stress oxydatifs (Ristimaki *et al.*, 1994). Le gène de la COX-2 est localisé sur le chromosome 1 et code pour une protéine de 71 kDa. Les différents éléments de régulation transcriptionnels du promoteur de la COX-2 sont : deux sites de liaison de NF κ B, un motif NF-IL6, deux séquences superposées boîte E et ATF/CRE, deux sites AP1 et trois sites Sp1 (**Figure I-14**).

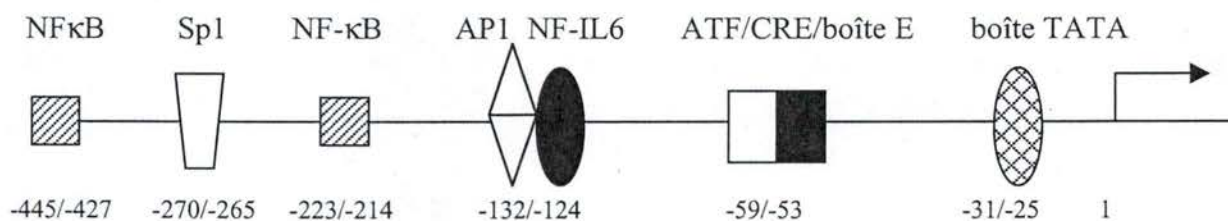


Figure I-14 : Eléments principaux de régulation dans le promoteur du gène humain COX-2.

Au delà de son implication dans le processus inflammatoire, la COX-2 intervient également au niveau de la régulation du cycle cellulaire ainsi qu'au niveau du processus apoptotique. En effet, de récents travaux ont montré que la surexpression de la COX-2 induisait un arrêt de prolifération chez des cellules mésangiales suite à l'augmentation du niveau protéique des CDKI p21^{WAF-1} et p27^{KIP-1} ainsi que du facteur de transcription p53 (Zahner *et al.*, 2002). De plus, un ralentissement dans la progression du cycle cellulaire due à une répression de la cycline D1, a également été mis en évidence chez les cellules épithéliales surexprimant la COX-2 (DuBois *et al.*, 1996).

D'autre part, l'inhibition de la COX-2 chez des cellules cancéreuses du colon HCA-7 entraîne une augmentation du taux relatif de mort cellulaire (Sheng *et al.*, 1997) alors que des cellules épithéliales surexprimant COX-2 deviennent résistantes à l'apoptose en augmentant leur niveau de Bcl-2, une protéine anti-apoptotique (Tsujii and DuBois, 1995). Il semblerait donc

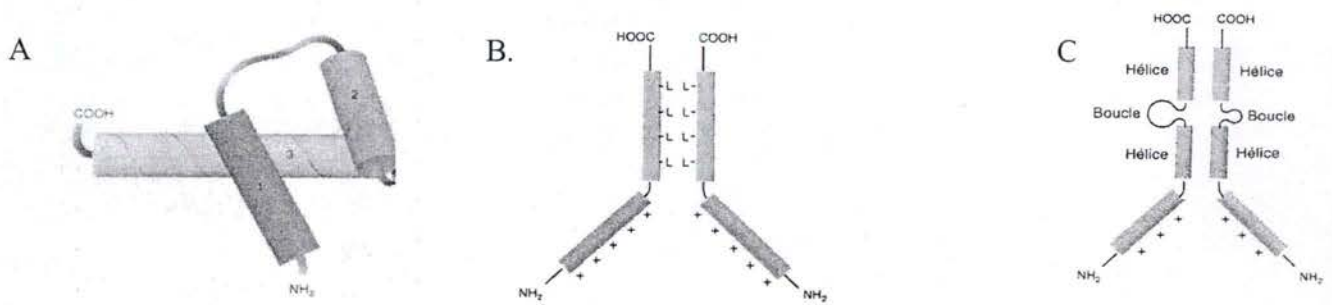


Figure I.15 : Modèles structuraux des différents domaines de liaison à l'ADN (Watson, 1994).

- (A) Modèle de type *helix-turn-helix*.
- (B) Modèle de type *basic leucine zipper*.
- (C) Modèle de type *basic helix-loop-helix*

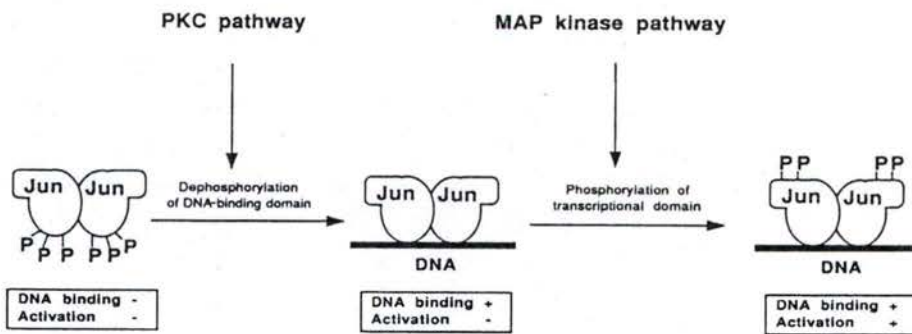


Figure I.16: Régulation de l'activation du facteur de transcription c-Jun par phosphorylation (Jackson, 1992).

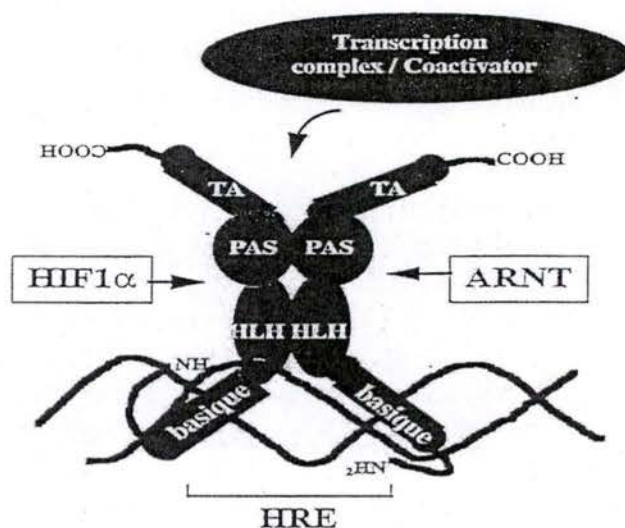


Figure I.17 : Structure du facteur de transcription HIF-1 (d'après le mémoire de Mottet D. 1999).

que la COX-2, outre son implication dans le processus inflammatoire, présente des caractéristiques anti-prolifératives et anti-apoptotiques. Ces caractéristiques se retrouvent chez les cellules en SIPS et en sénescence répliative. C'est pour ces raisons, que nous nous sommes intéressés à cette enzyme dans le cadre de ce travail.

VII. Variation d'activité de liaison de différents facteurs de transcription

Les facteurs de transcription sont des protéines qui se lient à des séquences consensus sur l'ADN, et influencent le niveau d'expression des gènes contrôlés par ces séquences. Ces facteurs de transcription jouent un rôle capital dans le fonctionnement cellulaire puisqu'ils permettent à la cellule de contrôler l'expression de son génome en réponse à des modifications de l'environnement cellulaire. Dès lors, les facteurs de transcription constituent un centre d'intérêt dans tous les processus cellulaires, qu'il s'agisse de prolifération, de différenciation, de réponse à des cytokines ou à des stress, etc.

En règle générale, un facteur de transcription est constitué essentiellement de trois types de domaines : un domaine de liaison à l'ADN, un domaine transactivateur ainsi qu'un domaine régulateur.

➤ Le domaine de liaison à l'ADN permet aux facteurs de transcription de se lier à une séquence d'ADN qui leur est propre. Cette séquence consensus est spécifique à chaque facteur de transcription ou spécifique à une famille de facteurs de transcription. Les facteurs de transcription peuvent être groupés en plusieurs classes, selon la structure tridimensionnelle de leur domaine de liaison à l'ADN (pour une revue (Angrand, 1993). Parmi les motifs structuraux les plus fréquents, on retrouve le modèle de type hélice-coude-hélice (*helix-turn-helix*), les protéines possédant des agrafes à leucines (*basic leucine zipper*), les protéines à hélice-boucle-hélice basiques (b-HLH) et enfin les protéines en doigts de zinc (**Figure I.15**).

➤ Le domaine transactivateur paraît fonctionner soit par interaction directe avec les composants de la machinerie transcriptionnelle, soit par le biais de cofacteurs (coactivateurs ou corépresseurs) qui interagiront avec le complexe transcriptionnel. Le résultat final aboutit ainsi à une stimulation ou à une répression de l'expression d'un ou d'une série de gènes particuliers.

➤ Le domaine régulateur permet de réguler l'activité des facteurs de transcription via différents processus. Parmi ceux-ci, on retrouve la phosphorylation, la dimérisation et la translocation.

- La phosphorylation, qui peut réguler aussi bien l'activité de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription que son activité transactivatrice. C'est le cas par exemple pour c-jun (**Figure I.16**), un membre de la famille AP-1 (Activated protein-1) composée de c-Jun et de c-Fos qui, sous forme inactive, possède trois résidus phosphorylés constitutivement dans son domaine de liaison à l'ADN. Ce facteur de transcription est incapable de se lier à l'ADN sous cette forme. Pour que c-Jun exerce une activité transactivatrice, il faut non seulement la déphosphorylation de son domaine de liaison, mais encore que deux résidus de son domaine transactivateur soient phosphorylés (Karin *et al.*, 1997). Le facteur de transcription CREB (cAMP-Response-Element-Binding protein) représente un autre exemple d'activation par phosphorylation. Ce n'est que lorsque CREB est phosphorylée

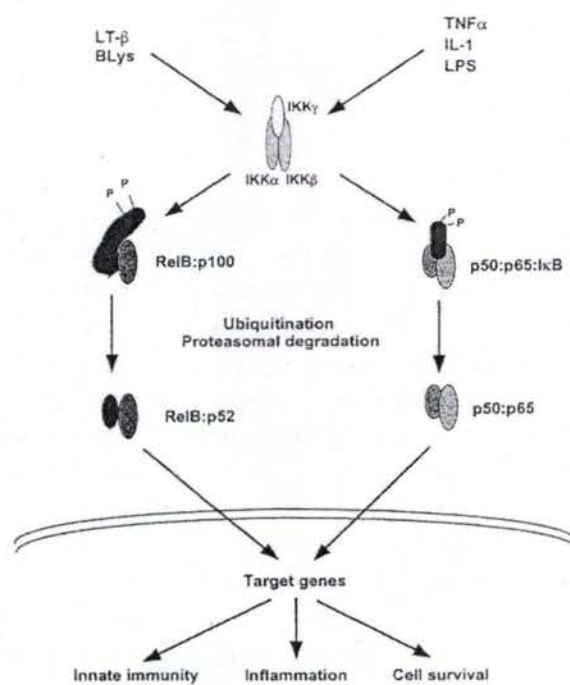


Figure I.18 : Modèle montrant la translocation nucléaire de NF κ B suite à son activation.

qu'il peut interagir avec CBP et de ce fait augmenter le taux de transcription du gène contrôlé (De Cesare *et al.*, 1999).

- La dimérisation avec un partenaire permet à certains facteurs de transcription de jouer leur rôle d'activateur transcriptionnel. C'est ainsi que le facteur HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1) n'est actif que lorsqu'il hétérodimérise avec ARNT (Aryl/hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator) (**Figure I.17**) (Semenza, 2000).
- La translocation nucléaire permettant à certains facteurs de transcription d'accéder aux noyaux et donc de se fixer sur leur séquence consensus. L'exemple le plus connu de régulation transcriptionnelle via translocation est certainement le facteur de transcription NFκB (Nuclear Factor kappa B). En dehors de toute stimulation, celui-ci est maintenu dans le cytoplasme par IκB (Inhibitor kappa B) qui masque sa séquence NLS (Nuclear Localisation Sequence) (**Figure I.18**). Toutefois, lorsque les cellules sont activées, IκB est phosphorylé avant d'être protéolysé, ce qui aboutit à la translocation nucléaire de NFκB. Une fois dans le noyau, il pourra se lier à sa séquence cible sur l'ADN et activer la transcription des gènes en aval (Ghosh and Karin, 2002).

De nombreux facteurs de transcription interviennent dans la mise en place de la sénescence. Cependant, il existe des variations dans l'activité de ceux-ci suivant le type cellulaire étudié et / ou le stress qui leur sont imposés.

Nous nous sommes donc intéressés à ces différents facteurs de transcription en vérifiant leur variation d'activité de liaison à l'ADN par une méthode colorimétrique en plaque multi-puits.

Cette méthode a été développée au sein de notre laboratoire afin d'estimer, dans un extrait cellulaire, l'activité de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription précis (Renard *et al.*, 2001). Le test est basé sur le principe de l'ELISA, excepté que la protéine d'intérêt est capturée non pas par un anticorps mais par une sonde oligonucléotidique contenant la séquence consensus de cette protéine.

Cela implique que seuls les facteurs de transcription capables de se lier à l'ADN, éventuellement suite à une activation cellulaire, seront capturés par les sondes fixées dans les puits. La liaison de la protéine à sa séquence consensus est alors détectée par un anticorps qui lui est spécifique suivi d'un anticorps secondaire conjugué à une peroxydase. Les résultats sont finalement quantifiés par une réaction chromogénique (**Figure I.19**).

Ce système de détection colorimétrique est simple à mettre en œuvre, plus rapide et généralement plus sensible que l'EMSA et permet de traiter simultanément un grand nombre d'échantillons étant donné que ce test se fait sur un format 96 puits.

Les différents facteurs de transcription que nous allons étudier sont : NFκB, AP1, ATF2, CREB, SP1.

VIII. Expression différentielle de gènes impliqués dans la sénescence

Afin d'identifier des gènes intervenant dans l'apparition de la SIPS chez les fibroblastes IMR-90 hTERT, nous avons utilisé la méthode du damier à ADN (**Figure I-20**).

TransAM

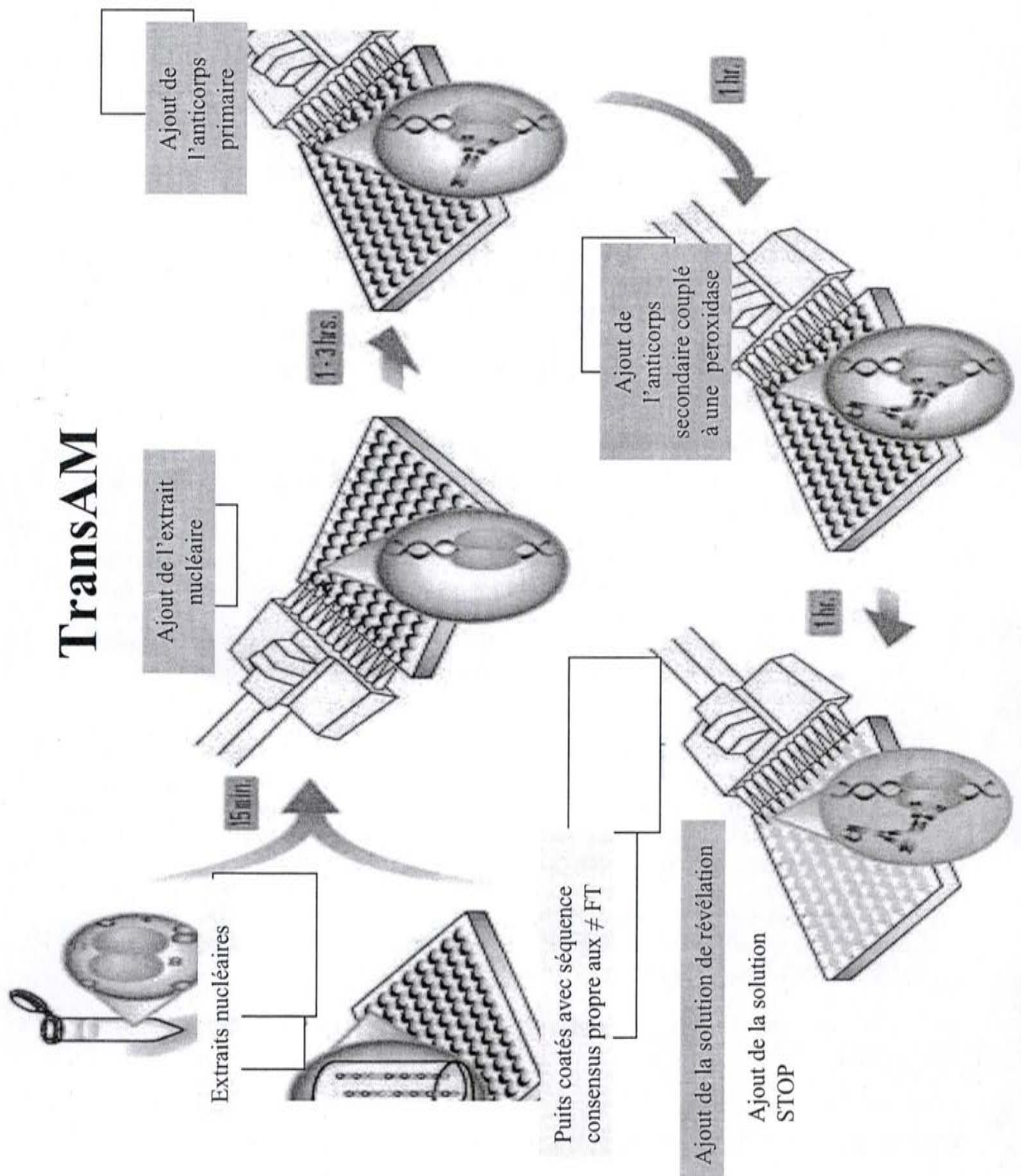


Figure I.19: méthode utilisée lors du test colorimétrique pour doser l'activité de liaison d'un facteur de transcription

Le microdamier permet une étude simultanée de l'expression de nombreux gènes. Sa construction implique la réalisation par PCR, d'ADN trappeurs qui sont fixés à la surface d'un support. Les ADN trappeurs repris sur le microdamier correspondent à une liste de gènes préalablement définie. La plupart des gènes choisis sont soit impliqués dans la prolifération cellulaire, soit dans les mécanismes de réponse au stress. Le microdamier réalisé est mis en présence d'échantillons d'ADN biotinylés issus de transcription inverse d'ARN messager. La révélation est réalisée par l'intermédiaire d'anticorps anti-biotine couplés à un fluorochrome (cyanine 3). Un scanner confocal permet l'obtention d'images utilisées pour la quantification de la variation de l'expression de gènes entre le contrôle et la condition de stress. Cette technique présente l'avantage de permettre en une seule hybridation l'étude de l'expression de l'ensemble des gènes repris sur le damier. Cependant, par rapport à des techniques plus conventionnelles telle la RT-PCR ou le northern blot, l'élaboration d'un microdamier nécessite du temps et la technique qui y est associée est onéreuse.

IX. But de ce mémoire

Lors de ce mémoire, nous tenterons de déterminer l'implication de la cyclooxygénase 2 (Cox-2) dans la sénescence induite prématurément par un stress subcytotoxique sous H_2O_2 chez des fibroblastes IMR-90 immortalisés par la sous unité catalytique de la télomérase. Nous vérifierons tout d'abord si une variation d'expression génique est observée pour Cox-2 et si celle-ci se traduit bien par une variation de sa quantité protéique.

Si les résultats se montrent satisfaisant, nous nous intéresserons aux différentes voies de transduction du signal capables d'influencer l'expression de la Cox-2 en étudiant les variations d'activité de facteurs de transcription et de certaines Kinases.

Nous réaliserons également une étude transcriptomique par l'utilisation d'un damier à ADN afin de caractériser de façon plus générale le phénotype de sénescence prématurée observé dans ce modèle.

Enfin, afin de valider les résultats obtenus suite à l'analyse du damier à ADN, nous sélectionnerons certains gènes pour une étude en Real Time RT-PCR.

Schéma d'hybridation sur damier à ADN

Fibroblastes IMR90 hTERT

Fibroblastes IMR90 hTERT : Stressés sous H_2O_2

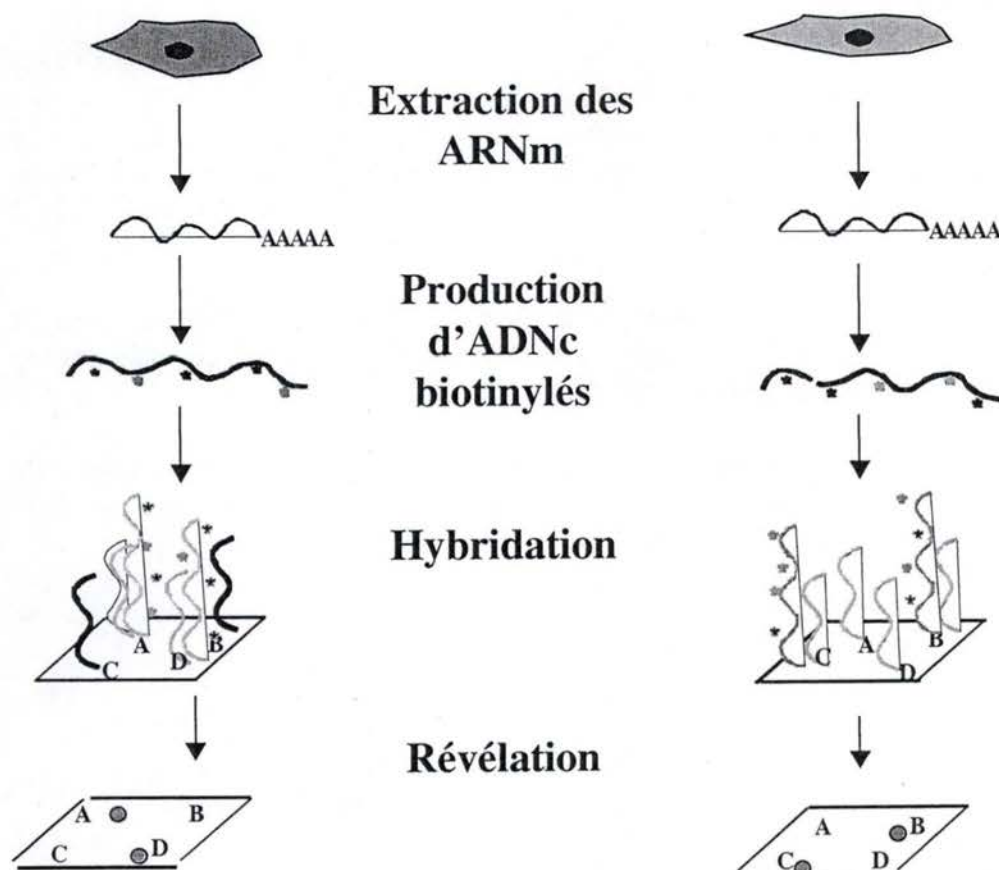


Figure I.20 : Schéma général du principe du damier. L'ARNm est d'abord purifié et ensuite rétro-transcrit en ADN complémentaire. Lors de la rétro-transcription, il y a incorporation de dCTP biotinylés qui permettront la visualisation des spots. Cette visualisation se fait grâce à un anticorps anti-biotine couplé à un fluorochrome, la cyanine 3.

Matériel
et
Méthodes

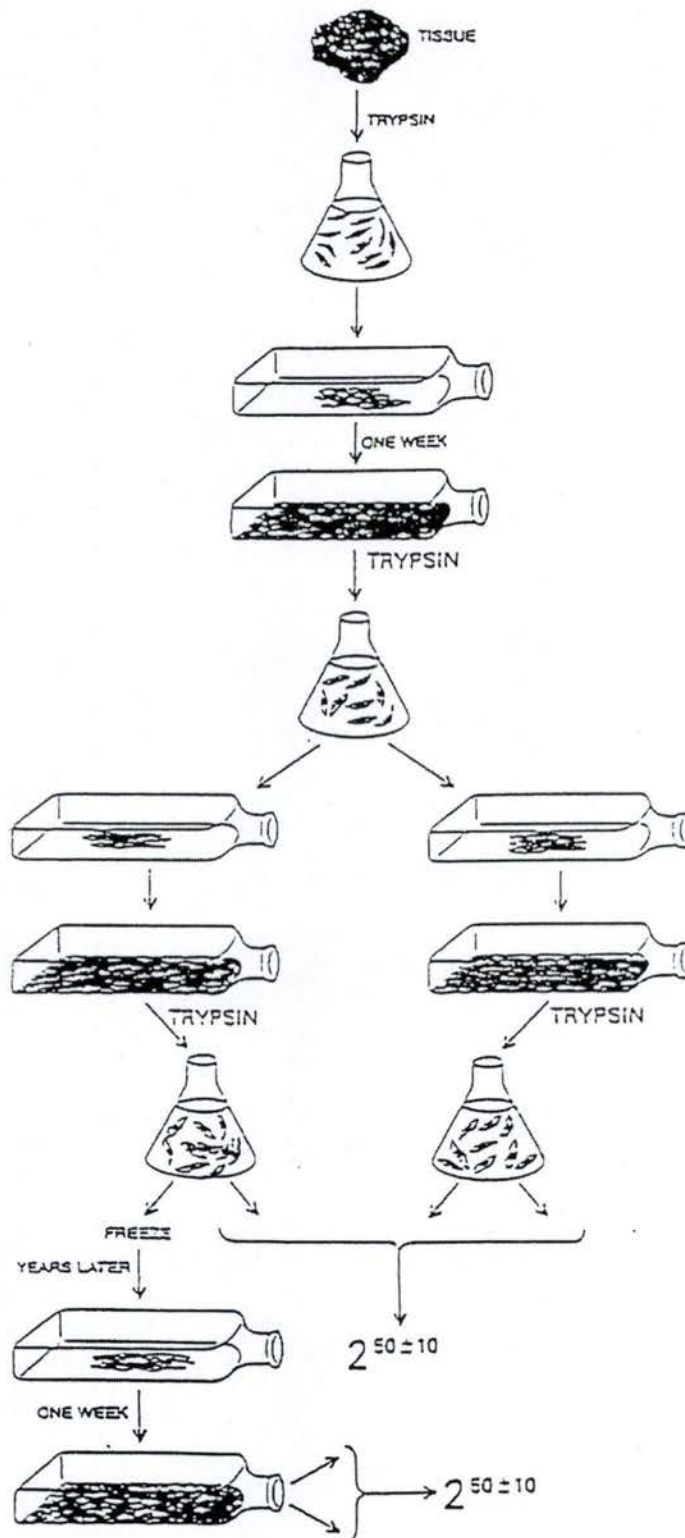


Figure II.1 : Schéma représentant le principe de culture cellulaire sériée [Hayflick, 1961].

I. Culture cellulaire

Dans le cadre de ce travail, nous avons utilisé des fibroblastes de souche IMR-90, immortalisés par la sous unité catalytique de la télomérase hTERT. Ces cellules sont maintenues en culture selon la méthode classique décrite par Hayflick (Hayflick, 1965). Elles sont cultivées dans des boîtes de 75 ou 150 cm² (T75 ou T150). Une fois que les cellules atteignent un état de confluence, elles sont repiquées dans des conditions stériles. (Figure II.1).

Matériel

- MEM : Milieu Modifié de Eagle (Invitrogen, UK)
- Antibiotiques: - Streptomycine sulfate 100 µg/ml (Sigma, USA)
- Pénicilline 100 U/ml (Sigma, USA)
- FBS : sérum de veau fœtal (Gibco, UK)
- Solution de trypsine : trypsine à 0,25 % dans un tampon tris (Gibco, UK)
- PBS : Tampon phosphate salin (10 mM, NaCl 0,9 %, pH 7,4)
- Boîtes de culture stériles de 75 cm² (T75) et 150 cm² (T150)

Méthode

- Préchauffer le milieu de rinçage (PBS), le milieu de culture (MEM + 10 % FBS + antibiotiques) et la trypsine à 37°C
- Décanter l'ancien milieu et rincer les cellules avec 10 ml de PBS afin d'éliminer toute trace de sérum, en effet, celui-ci contient des protéases capables d'inhiber l'action de la trypsine)
- Ajouter 1 ml de trypsine par T75 et incuber à 37°C jusqu'à ce que les cellules soient détachées
- Ajouter 10 ml de milieu de culture et rompre les agrégats cellulaires à l'aide d'une pipette pasteur
- Répartir les cellules en 2 ou 4 T75 et ajouter du milieu pour obtenir un volume final de 15 ml. Ensuite incuber les cellules dans une étuve à 37°C

II. Stress subcytotoxiques sur les fibroblastes IMR-90 hTERT et apparition des biomarqueurs associés à la sénescence

II.1. Description du stress

Le traitement des cellules consiste en un stress unique d'H₂O₂ à une concentration de 200 µM dans du milieu de culture durant deux heures

Matériel

- Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) 10 M (Merck, Germany)
- Seringue 10 ml (Terumo Europe nv, Belgium)
- Filtre 0.2 µM (Sarstedt, Germany)
- Milieu de culture : milieu MEM additionné de 10 % de sérum de veau fœtal

Méthode

- Repiquer les cellules à 50 % de confluence la veille du traitement
- Diluer 100 fois l'H₂O₂ dans l'eau distillée (en condition non stérile)
- Sous hotte, stériliser la solution en utilisant le filtre et la seringue
- Diluer la solution dans du milieu de culture de 10 en 10 fois jusqu'à une concentration de 200 µM

- Remplacer le milieu de culture cellulaire par le milieu de stress et laisser les cellules dans une étuve à 37°C pendant 2 h
- Décanner les boîtes et remettre du milieu de culture

II.2. Détection de l'activité β -galactosidase associée à la sénescence (SA β -gal)

Matériel

- Solution de fixation : Formaldéhyde 2 % (Belgolabo, Belgium)
Glutaraldéhyde 0,2 % (Fluka, Holland)
- Solution X-gal : 20 mg/ml de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside (Eurogentec, Belgium)
- Solution de coloration : - Tampon phosphate à pH 6 (Merck, Germany)
 - Ferrocyanure de potassium 0,1 M (Merck, Germany)
 - Ferricyanure de Potassium 5mM (Merck, Allemagne)
 - Chlorure de sodium (NaCl) 5 M (Merck, Germany)
 - Chlorure de magnésium ($MgCl_2$) 1 M (Merck, Germany)
- Milieu de culture complet
- Méthanol (Accross organics, Belgium)
- Plaque 6 puits stérile (Corning, Belgium)

Méthode

- Le lendemain du stress, repiquer les cellules à une densité de 100 cellules par cm^2 et incuber 24 h à 37°C dans une étuve diffusant de l'air contenant 5 % de CO_2
- Décanner le milieu de culture et rincer les cellules 2 fois avec du PBS (2ml)
- Fixer les cellules dans 2 ml de solution de fixation pendant 5 minutes, puis rincer de nouveau 2 fois avec du PBS
- Ajouter 2 ml de solution de coloration et incuber les cellules de 13 à 17 heures à 37°C dans une étuve sans CO_2
- Laver les cellules deux fois avec du PBS, puis les sécher avec du méthanol
- Compter au microscope optique le nombre de cellules présentant une activité SA β -gal par rapport aux cellules non colorées (puits de cellules contrôles/puits de cellules stressées)

II.3. Estimation de la synthèse d'ADN par incorporation de thymidine tritiée

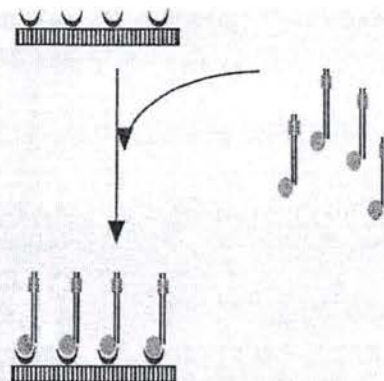
Matériel

- Thymidine tritiée ($[^3H]$ -T) (Perkin Elmer, USA)
- Acide trichloroacétique (TCA) 10 % (Merck, Germany)
- Ethanol 70 % (SDS, France)
- NaOH 0,5 M et HCl 0,5 M (Merck, Germany)
- Aqualuma (Lumac, Holland)
- Compteur à scintillation modèle 2100 TR (Packard Instrument Company, USA)
- Plaque 24 puits stérile (Corning, Belgium)

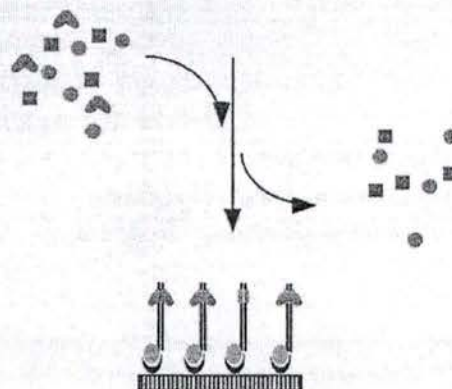
Méthode

- Repiquer les cellules dans une plaque 24 puits à raison de 20 000 cellules par puits, chaque puits recevant 1ml de milieu de culture contenant $1\mu Ci/ml$ de thymidine tritiée
- Incuber les cellules pendant 24 h à 37°C afin de permettre l'incorporation de la thymidine tritiée
- Après 24 h d'incorporation, décanner le milieu de culture et rincer les cellules 2 fois au PBS, une fois au TCA 10 %, une fois à l'éthanol, et une nouvelle fois au PBS

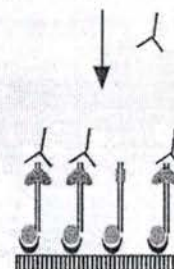
STEP 1: Fixation of a biotinylated double strand probe containing the p53 consensus binding sequence on streptavidin-coated plates
+ Washing



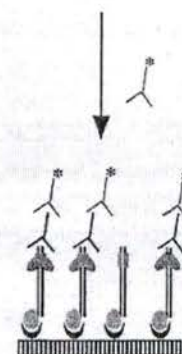
STEP 2: Incubation with cell lysates
+ Washing



STEP 3: Incubation with mouse anti-p53 antibodies
+ Washing



STEP 4: Incubation with peroxidase-conjugated anti-rabbit antibodies
+ Washing



STEP 5: Colorimetric reaction

Figure II.2 : Méthode colorimétrique permettant de doser l'activité de liaison d'un facteur de transcription sur plaque multipuits

- Ajouter 250 µl de NaOH 0,5 M afin de lyser les cellules et incubé pendant 30 min
- Neutraliser l'action du NaOH avec un équivalent d'HCl 0,5 M
- Homogénéiser et reprendre toute la solution à laquelle est ajouté 5 ml d'aqualuma : cette substance permet de visualiser l'incorporation de thymidine tritiée au compteur à scintillations par une réaction qui transforme l'énergie radioactive contenue dans la solution en une énergie lumineuse

III. Dosage de l'activité de liaison à l'ADN du facteur de transcription en plaques multipuits (Trans-AM)

III.1. Principe

Afin de doser l'activité de liaison d'un facteur de transcription à sa séquence consensus. Nous utilisons des plaques multipuits au fond desquelles est coaté la séquence d'ADN consensus d'un facteur de transcription d'intérêt (F.T). On dépose dans ces puits les extraits de protéines nucléaires pour permettre au F.T. de se lier à sa séquence consensus. On ajoute ensuite un anticorps primaire spécifique au F.T. étudié et un anticorps secondaire couplé à une peroxydase. Cette peroxydase servira à révéler la quantité de F.T. fixé au fond des puits en clivant un substrat dont le produit est chromogène. Il s'en suivra une analyse au spectrophotomètre pour quantifier la coloration des puits (**figure II.2**).

III.2. Extraction de protéines nucléaires

Matériel

- PBS
- HB 2x (Hypotonic Buffer) : 10 mM NaF (Merck, Germany), 2 mM Na₂MoO₄ (Sigma, USA), 40 mM Hepes pH 7,9 (Acros Organics, Belgium) et 0,2 mM EDTA (Titriplex, Merck, Germany)
- Solution de lyse : HB 1x, NP-40 0,5 % (Nonidet P-40, Sigma, USA)
- Re (Re-suspension Buffer) : HB 1x, glycérol 17,4 % (Merck, Germany)
- Sa (Saline Buffer): HB 1x, glycérol 17,4 % (Merck, Germany), NaCl 0,4 M (Merck, Germany)
- PIC (Protease Inhibitor Cocktail) (Roche, Germany): une tablette de PIC diluée dans 2 ml H₂O
- PIB (Phosphatase Inhibitor Buffer): 25 mM Na₃VO₄ (Sigma, USA) ; 250 mM PNPP (p-Nitrophenyl Phosphate; Sigma, USA) ; 250 mM βglycérol phosphate (Sigma, USA) et 125 mM NaF (Merck, Germany)
- Raclours (Dispenser, Belgium)
- Microtubes

Méthode

- Décanter les boîtes et rincer 2 fois les cellules avec 10 ml de PBS froid (4°C)
- Ajouter 10 ml de HB 1x, laisser 5 min sur glace puis décanter totalement
- Racler les cellules dans 500 µl de tampon de lyse
- Transférer les lysats cellulaires dans un microtube et centrifuger 30 sec à 13000 rpm
- Après élimination du surnageant, resuspendre le culot cellulaire dans du Re (30 µl/T75) et ensuite dans du Sa (35 µl/T75)
- Agiter les tubes sur une roue en chambre froide (4°C) pendant minimum 30 min
- Centrifuger les tubes à 13000 rpm pendant 10 min à 4°C afin d'éliminer les débris cellulaires et récolter les surnageants

Anticorps Primaires	
p-ATF2	sc-8398 Santa Cruz, USA
c-Fos	sc-7202 Santa Cruz, USA
SP1	sc-59 Santa Cruz, USA
p-creb	06-519 Upstate, UK
NFκB	sc-7178 Santa Cruz, USA

Anticorps Secondaires	
IgG Lapin	sc-2054 Santa Cruz, USA
IgG Souris	sc-2055 Santa Cruz, USA

Tableau II.1 : Liste des anticorps utilisés pour l'étude TRANS-AM

- Stocker à -70°C après avoir effectué un dosage de protéines selon la méthode de Bradford

III.3. Dosage des protéines selon la méthode de Bradford

Matériel

- Etalon : BSA : Bovin Serum Albumin ($2\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
- Colorant : Bio-Rad Protein Assay (Biorad, Germany)
- Eau distillée
- Extraits nucléaires à doser
- Spectrophotomètre (Perkin Elmer, USA)

Méthode

- Mettre 1 ml de colorant Bradford par tubes (faire des triples) et ajouter toutes les 30 sec :
 - 2 μl d'eau distillée dans les tubes « blancs »
 - 2,5 μl de l'étalon dans les tubes « étalons »
 - 2 μl d'extraits nucléaires des cellules stressées ou non
- Incuber 5 min à température ambiante, puis lire, toutes les 30 sec, l'absorbance à 595 nm
- Déterminer la concentration protéique de nos échantillons d'après la valeur d'absorbance mesurée pour l'étalon

III.4. Détection de l'activité de liaison à l'ADN du facteur de transcription en plaque 96 puits

La composition des différents tampons peut varier d'un F.T. à l'autre. Voici, en exemple, le protocole utilisé pour doser l'activité de liaison à l'ADN du facteur de transcription ATF-2.

Matériel

- Tampon de lyse : 1 ml Re (cfr III.2), 1 ml Sa (cfr III.2), 80 μl PIC (cfr III.2), 80 μl PIB (cfr III.2), 2 μl DTT 1 M (Dithiotréitol, Sigma, USA)
- Tampon de liaison: tampon de binding AP1 (1 x, pH 7,5) de composition:
 - 2 mM Hepes
 - 8 mM NaCl (Merck, Germany)
 - 0,2 mM EDTA (Merck, Germany)
 - Glycérol 12 % (Merck, Germany)
- Strips de plaques streptavidine fixés avec le trappeur
- PBS et PBS 50 (tampon phosphate 10 mM; pH 7,4; NaCl 0.3 %)
- Tween 20 (Sigma, USA)
- Gloria (Nestle, Belgium)
- BSA (100K1355, USA)
- Anticorps primaires et secondaires (**tableau II.1**)
- TMB : Tetra-Methyl Benzidine (Biosource, Belgium)
- Solution stop : H_2SO_4 (Biosource, Belgium)
- Lecteur de plaques multipuits (Ultramark, Microplate Imaging System, Biorad, Germany)

Méthode

Liaison du facteur de transcription à sa séquence consensus

- Préparer les extraits nucléaires, dilués au moyen du tampon de lyse, à une concentration finale de 5 $\mu\text{g}/10\mu\text{l}$

- Dispenser 40 µl de tampon de liaison 1 fois par puits et 10 µl d'extraits protéiques pour les puits « tests » et 10 µl de tampon de lyse pour les « blancs »
- Recouvrir la plaque d'un film autocollant et incuber 1 h, à température ambiante, sous légère agitation
- Laver les puits 3 fois 2 min avec 200 µl de PBS + tween 20 0,1 %

Fixation de l'anticorps primaire

- Diluer 1000 fois l'anticorps primaire dans le PBS 50 + BSA 0,5 %
- Dispenser 100 µl de cette dilution par puits et recouvrir d'un film autocollant
- Incuber 1 heure à température ambiante avant de laver les puits 3 fois 2 min avec 200 µl de PBS + tween 20 0,1 %

Fixation du conjugué anticorps anti-lapin/peroxydase

- Diluer 1000 fois l'anticorps secondaire dans le PBS 50 + gloria 1 % et dispenser 100 µl de cette dilution par puits
- Recouvrir la plaque d'un film autocollant et incuber 1 h à température ambiante avant de laver les puits 4 fois 2 min avec 200 µl de PBS + tween 20 0,1 %

Révélation

- Dispenser 100 µl de TMB par puits et incuber 10 min à température ambiante et à l'abri de la lumière (dans papier aluminium)
- Dispenser 100 µl de solution stop par puits et lire la densité optique à 450 nm (référence à 655 nm)

IV. Western Blotting

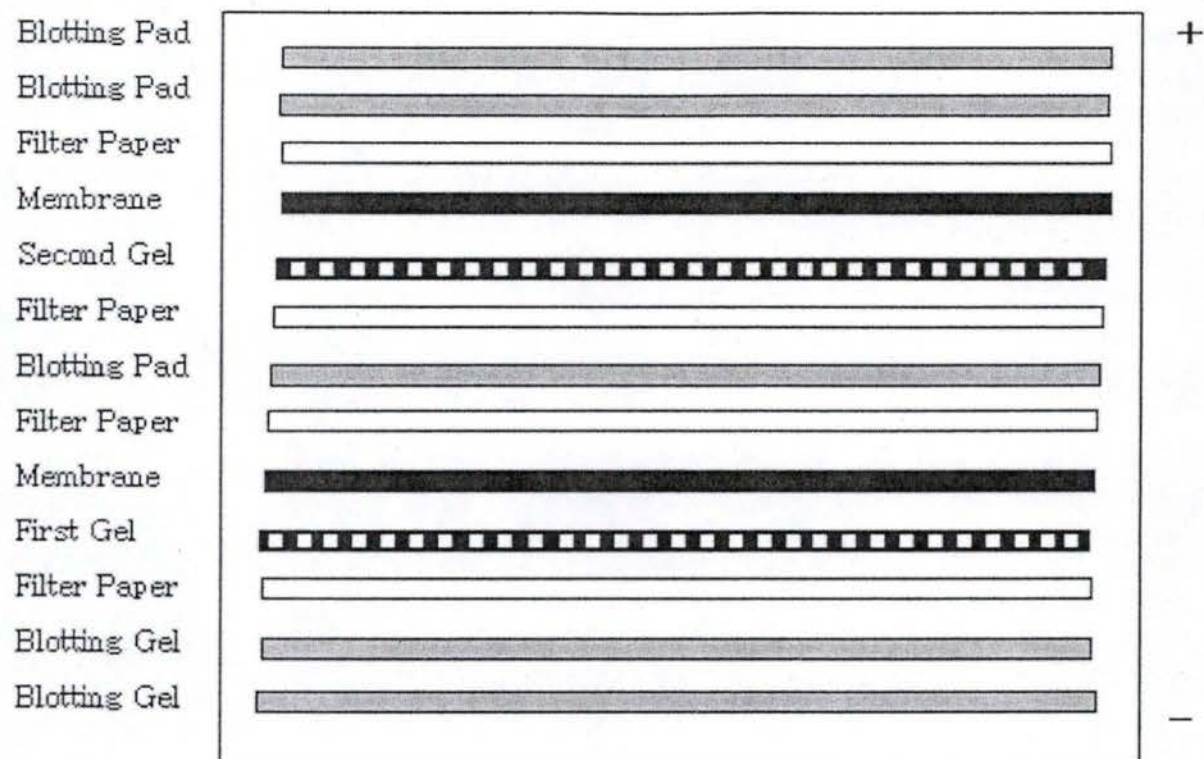
IV.1. Principe

Les extraits protéiques, préparés à partir de lysats cellulaire, sont chargés sur un gel d'acrylamide en présence de SDS, qui dénature les protéines et les charge négativement. Cette migration permet de séparer les protéines selon leur poids moléculaire. Elles sont ensuite transférées sur une membrane de polyvinylidène difluorure (PVDF). Dès lors, il est possible de détecter la protéine d'intérêt à l'aide d'un anticorps spécifique (anticorps primaire) dirigé contre l'un de ses épitopes. Dans un second temps, un anticorps secondaire reconnaissant les fragments Fc de l'anticorps primaire est ajouté. Cet anticorps secondaire est couplé à une peroxydase. Enfin, la révélation est réalisée en présence du substrat de la peroxydase et de luminol. L'oxydation du luminol s'accompagne d'émission de lumière qui peut être détectée à l'aide d'un film photographique.

IV.2. Extraction protéique

Matériel

- Tampon de lyse:
 - Tris HCl 10 mM pH 7,4 (ICN, Biomedicals, USA)
 - NaCl 100 mM (Merck, Germany)
 - Glycérol 10 % (Merck, Germany)



Système sandwich

Figure II.3 : Représentation schématique du système « sandwich » utilisé pour le transfert des protéines du gel sur une membrane de PVDF lors d'un western blotting.

- NP-40 1 %
- SDS 0,1 % (ICN, Biomedicals, USA)
- Déoxycolate 0,5 %
- PBS

Méthode

- Rincer les cellules 2 fois avec du PBS froid
- Ajouter 500 µl de tampon de lyse par T75 et racler les cellules
- Récolter le lysat dans un microtube et le laisser sur glace pendant 30 min minimum
- Centrifuger à 13000 rpm pendant 10 min à 4°C afin de culotter les débris cellulaires insolubles et transférer le surnageant dans un nouveau microtube
- Aliquoter et congeler les échantillons à -20°C

IV.3. Préparation des échantillons et migration

Matériel

- Sample buffer (Invitrogen, USA)
- DTT 1 M (Sigma, Germany)
- Gel 10 % Bis-tris gel NUPAGE (Invitrogen, USA)
- Tampon de migration: 50 ml de Tampon MOPS (Invitrogen, USA) + 950 ml d'eau distillée (pour le compartiment extérieur), prélever 200 ml de ce tampon et y ajouter 500 µl d'antioxydant NuPage (Invitrogen, USA) (pour le compartiment intérieur de la cuve)
- Cuve d'électrophorèse (Novex minigel-cell, Invitrogen, USA)
- Étalon de poids moléculaire : Seeblue plus 2 (Invitrogen, USA)
- Générateur (Biorad Power PAC 300)

Méthode

- Chauffer les lysats cellulaires à 70°C pendant 10 min et les centrifuger 30 sec à 13000 rpm
- Déposer les échantillons sur gel et laisser migrer 50 min sous 200 volts dans le tampon de migration

IV.4. Transfert sur membrane PVDF

Matériel

- Cuve de transfert (Novex Mini-gel, Invitrogen, USA)
- Papier Whatman (Merck, Germany)
- Membrane PVDF (Amersham, UK)
- Tampon de transfert : 50 ml de tampon de transfert NUPAGE (Invitrogen, USA), 20 ml de méthanol (Across organics, Belgium) et porter à 200 ml avec de l'eau distillée

Méthode

- Démouler le gel et le déposer sur membrane PVDF selon une disposition en sandwich (**figure II.3**)
- Placer le tout dans une cuve de transfert dans laquelle deux électrodes entourent le montage suivant : la membrane (vers l'anode) et le gel (vers la cathode) sont placés entre 2 papiers whatman imbibé du tampon de transfert
- Le transfert des protéines du gel sur la membrane PVDF se fait sous 30 volts pendant 2 h en présence de tampon de transfert

Anticorps Primaires	
ATF-2	#9222; Cell Signaling, USA
ATF-2-P (Thr71)	#9221; Cell Signaling, USA
a-tubuline	AM2495-11; Innogenex, USA
c-Fos	sc-7202; Santa Cruz Biotechnology, USA
c-Jun	sc-1694; Santa Cruz Biotechnology, USA
c-Jun-P (Ser63)	#9261; Cell Signaling, USA
c-Jun-P (Ser73)	#9164; Cell Signaling, USA
Cox-2	160112 ; Cayman Chemical, USA
p21	sc-6246; Santa Cruz Biotechnology, USA
p38	#9212; Cell Signaling, USA
p38-P (Thr180/Tyr182)	#9211; Cell Signaling, USA

Anticorps Secondaires	
Anti-rabbit	NA934V; Amersham, UK
Anti-mouse	NA931V; Amersham, UK

Tableau II.2 : Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés lors de ce travail

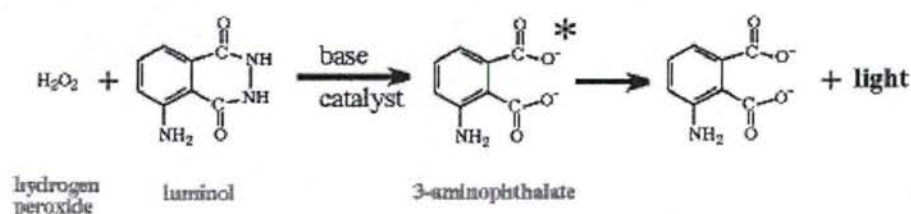


Figure 2.4 : Schéma représentant la réaction de chémiluminescence permettant la révélation d'un Western blot. En présence d' H_2O_2 , la peroxydase HRP (Horse Raddish Peroxydase) réagit avec le luminol. Cette réaction produit, entre autres, des photons qui seront captés sur un film autoradiographique.

IV.5. Blocking et révélation

Matériel

- Tampon de rinçage: TBS Tween 0,1 %
- Anticorps primaires et anticorps secondaire (**Tableau II.2**)
- Substrat de révélation (ECL) (Amersham, UK)
- Film autographique (Amersham, UK)
- Solution de révélation et de fixation (Ilford 2000RT Imaging, USA)

Méthode

- Bloquer la membrane en présence de TBS-T 0,1 % contenant 2 % de lait Amersham durant 2 h sur un rotateur afin de saturer les sites de liaison non spécifiques que pourraient reconnaître les anticorps utilisés
- Incuber la membrane avec l'Ac primaire dilué de 2000 à 5000 fois dans du TBS-T 0,1 % contenant 2 % de lait Amersham durant 1 h à RT ou pendant une nuit
- Rincer la membrane 3 fois durant 15 min avec du TBS-T 0,1 % contenant 2 % de lait Amersham
- Incuber la membrane avec l'Ac secondaire dilué 100000 à 300000 fois dans du TBS-T 0,1 % contenant 2 % de lait Amersham durant 1 h à RT
- Rincer la membrane 3 fois 15 min avec du TBS-T 0,1 %
- Placer la membrane en contact avec une solution ECL (Enhanced Chemo Luminescent) pendant 5 min (**Figure II.4**)
- En chambre noire, exposer un film autoradiographique sur la membrane
- Placer le film dans la solution de révélation puis rincer dans de l'eau
- Placer le film dans la solution de fixation puis rincer à l'eau

V. Extraction d'ARN total

Matériel

- Kit Ribopure (Ambion, UK)
- Seringue avec aiguille 21G (Terumo, Belgium)
- Trypsine, PBS et MEM
- Chloroforme (Merck, Germany)
- Ethanol absolu (Merck, Germany)
- Eau RNase free (Promega, USA)

Méthode

- Récolter les cellules par trypsinisation (cfr I.culture cellulaire) et les transvaser dans un microtube RNase free
- Rincer les cellules avec 1ml de PBS, puis éliminer celui-ci par centrifugation 5 min à 2000 rpm
- Ajouter 1 ml de RNAwiz (solution de lyse) et passer la solution avec une aiguille 21G jusqu'à ce que la solution soit homogène puis, incubé 5 min à RT
- Ajouter 200 µl de chloroforme au lysat et mélanger pendant 30 sec (par inversion)
- Incuber 5 min à RT et mélanger une seconde fois 30 sec puis, centrifuger 5 min à 13000 rpm
- Récupérer la phase aqueuse ($\pm 500 \mu\text{l}$) et la mettre dans un nouveau microtube RNase free
- Ajouter 0,5 volume ($\pm 250 \mu\text{l}$) d'éthanol absolu et mélanger par inversion
- Transférer la mixture lysat/éthanol sur colonne et centrifuger 30 sec à 13000 rpm
- Ecarter ce qui est passé à travers le filtre et ajouter 700 µl de Wash solution 1

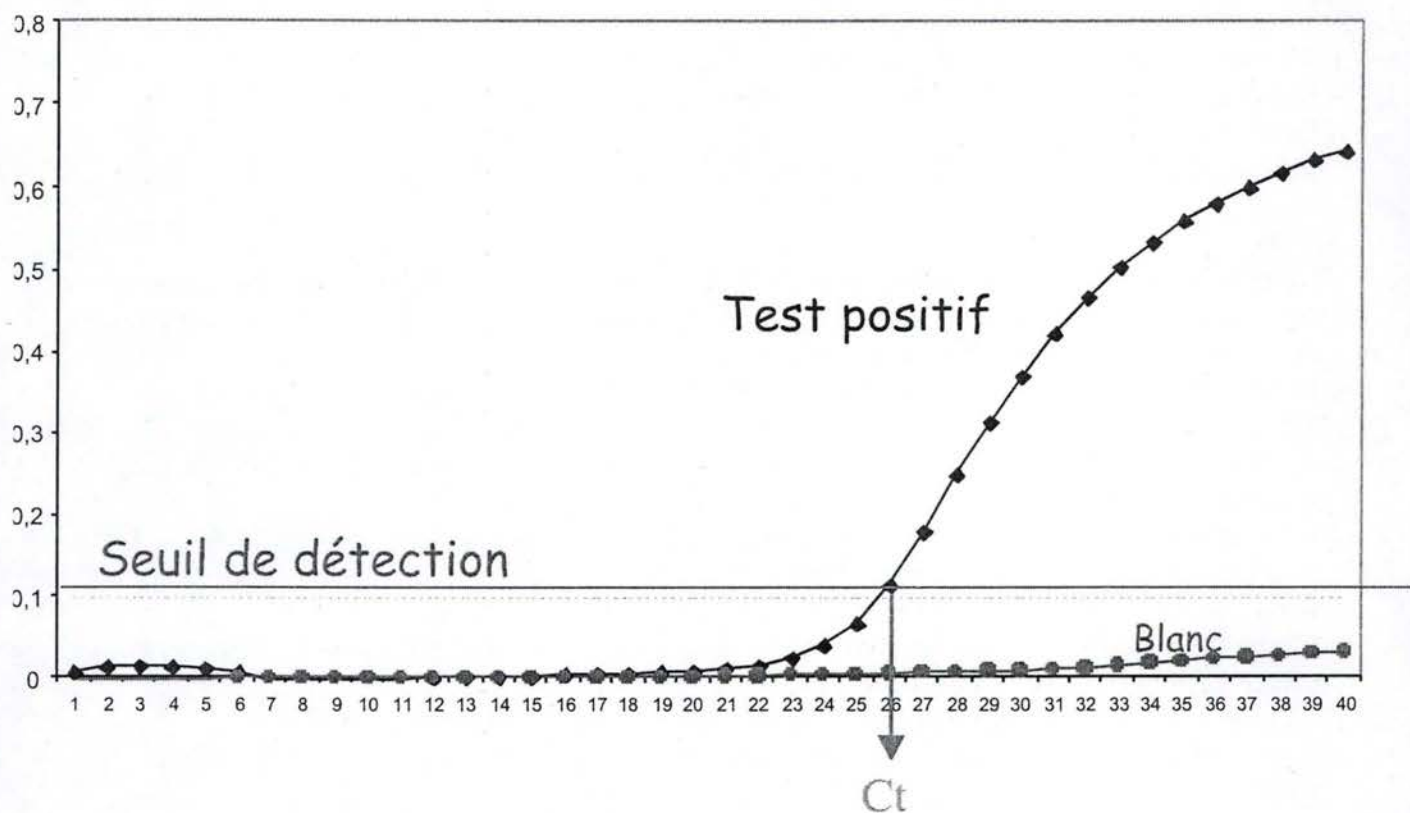


Figure II.5 : Courbe d'amplification obtenue par RT-PCR en temps réel, montrant la fluorescence émise par le SYBR Green en fonction des cycles PCR. Le Ct représente le cycle à partir duquel le signal de fluorescence est significativement différent du bruit de fond (Salmon, 2002).

- Centrifuger 30 sec à 13000 rpm et écarter ce qui est passé à travers le filtre
- Ajouter 500 µl de Wash solution 2/3, centrifuger 30 sec à 13000 rpm et écarter ce qui est passé à travers la colonne
- Recommencer l'étape précédente mais centrifuger 1 min à 13000 rpm
- Transférer la colonne sur un nouveau microtube et éluer l'ARN total en ajoutant 30 µl d'eau RNase free sur le centre de la colonne et centrifuger 1 min à 13000 rpm
- Doser et congeler les échantillons d'ARN total à -70°C

VI. Real Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Real Time RT-PCR)

VI.1. Principe

Cette méthode permet de quantifier le niveau relatif d'ARNm transcrit pour différents gènes analysés dans notre modèle en SIPS.

La PCR permet d'amplifier spécifiquement et de façon exponentielle un fragment d'ADN grâce à un couple d'amorce encadrant le fragment à amplifier. Dans le cas de la Real Time RT-PCR, la quantité d'amplicons produits est directement mesurable par l'intensité de fluorescence d'une molécule intercalante qui est ajoutée au mix PCR de départ (SYBR Green). Cette molécule s'intercale entre les deux brins d'ADN de façon non spécifique et émet un signal fluorescent proportionnel à la quantité d'ADN double brin présent. Cette méthode permet donc de suivre l'amplification au fur et à mesure des cycles PCR au sein même du tube PCR. La détermination de l'intensité de fluorescence est permise grâce au couplage d'un fluorimètre au thermocycleur de l'appareil PCR.

Le signal fluorescent est détecté à partir d'un certain seuil, ensuite, on observe une augmentation exponentielle avant d'arriver à un plateau de saturation. Le cycle correspondant au milieu de la phase exponentielle est appelé le cycle Ct (cycle seuil) (**figure II.5**). Ce cycle est inversement proportionnel à la quantité initiale d'ADN cible présent dans l'échantillon.

VI.2. Retro-transcription d'échantillons d'ARN

Cette étape permet la synthèse d'ADN complémentaire (cDNA) à partir d'ARN messager (ARNm). Elle fait appel à des amorces poly-T venant s'hybrider sur la queue poly-A des ARNm. La synthèse de l'ADNc est réalisée par l'élongation de l'amorce poly-T à partir de son extrémité 3' OH par une Superscript Reverse Transcriptase.

Matériel

- Oligo dT 500 ng/µl (Invitrogen, USA)
- Tampon 5 fois pour la superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, USA)
- Dithiothréitol (DTT) 0,1 M (Invitrogen, USA)
- dNTP mix 250 µM (Eurogentec, Belgium)
- RNAsin (40 U/µl) (Promega, USA)
- Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, USA)
- RNase H (2 U/µl) (Invitrogen, USA)
- Eau Rnase free (Promega, USA)

Méthode

- Préparation du mix d'ARN:
 - 2 µg d'ARN total
 - 500 ng d'oligo dT

Gènes	Séquence (sens 5'-3')	Concentrations
c-fos	TCA CCC GCA GAC TCC TTC TC GTG GGA ATG AAG TTG GCA CTG	300nM 300nM
Fibronectine	TGT GGT TGC CTT GCA CGA T GCT TGT GGG TGT GAC CTG AGT	900nM 900nM
GAPDH	ACC CAC TCC TCC ACC TTT GAC GTC CAC CAC CCT GTT GCT GTA	200nM 200nM
MMP-2	ATC GCA GAT GCC TGG AAT G CTT TGG TTC TCC AGC TTC AGG TAA T	300nM 300nM
Ostéonectine	GAG ACC TGT GAC CTG GAC AAT G GGA AGG AGT GGA TTT AGA TCA CAA GA	300nM 300nM
p21 ^{WAF-1}	CTG GAG ACT CTC AGG GTC GAA CCA GGA CTG CAG GCT TCC T	300nM 300nM
p53	AAG AAA CCA CTG GAT GGA GAA CAG CTC TCG GAA CAT CTC GAA	900nM 900nM
RPL13A	CTC AAG GTC GTG CGT CTG AA TGG CTG TCA CTG CCT GGT ACT	300nM 300nM
TGF-β1	AGG GCT ACC ATG CCA ACT TCT CCG GGT TAT GCT GGT TGT ACA	900nM 900nM
AOP2	GGA CGT GGC TCC CAA CTT T CGA GGG TGG GAG AAG AGA ATG	300nM 300nM
HSP27	TCCCTGGATGTCAACCACTTC CTCGTGCTTGCCGGTGAT	300nM 300nM
IGFBP3	CAGAGCACAGATACCCAGAACTTC CACATTGAGGAACTTCAGGTGATT	300nM 300nM
SOD2	CAAATTGCTGCTTGTCCAAATC GATTGATGTGTGGGAGCACG	300nM 300nM
Cox2	ATTAGCCTGAATGTGCCATAAGACT ACCCACAGTGCTTGACACAGAAAT	300nM 300nM

Tableau II.3 : Séquence des amorces utilisées pour la real-time RT-PCR et leur concentration optimale d'utilisation .

- ajuster à 10 µl avec de l'eau RNase free
- Chauffer le mix 10 min à 70°C, mélanger et refroidir sur glace 5 min
- Ajouter par tube:
 - 4 µl tampon 5 fois
 - 2 µl DTT 0,1M
 - 1 µl RNAsin
 - 1 µl dNTP mix
 - 1 µl eau RNase free
- Mélanger et incubé 5 min à température ambiante
- Ajouter 1,5 µl de SuperScript RII et incubé 1 h30 à 42°C
- Arrêter la réaction 15 min à 70°C, puis ajouter 1 µl de RNase H
- Incuber 20 min à 37°C et congeler immédiatement à -20°C

VI.3. Real-time RT-PCR

Recherche de couple d'amorces appropriées pour l'étude d'un gène

Le programme Primer Express (Applied Biosystems, Holland) permet de choisir des couples d'amorces répondant à différentes contraintes. La longueur de l'amplicon doit être comprise entre 50 et 150 pb afin d'obtenir une amplification optimale, celle des amorces varie entre 15 et 30 pb et leur contenu en C/G doit représenter 20 à 70 % de la séquence nucléotidique. Les amorces ne peuvent contenir au maximum 2 G et /ou C parmi les 5 derniers nucléotides à l'extrémité 3' afin de minimiser l'hybridation entre eux. De plus, la température de melting des 2 amorces doit se situer entre 58 et 60°C et celle-ci ne peut différer que de 1 ou 2 °C entre les 2 amorces. La liste des amorces est reprise dans le **tableau II.3**

Matériel

- Master mix « SYBR Green PCR » (Applied Biosystems, Holland)
- Plaque 96 puits (Applied Biosystems, Holland)
- Optical Adhesive Covers (Applied Biosystems, Holland)
- Amorces sens et antisens (Applied Biosystems, Holland)

Méthode

- Préparer le mix:
 - 12,5 µl du Mix SYBR Green
 - 2,5 µl d'amorce sens (à la concentration optimale)
 - 2,5 µl d'amorce antisens (à la concentration optimale)
 - 2,5 µl d'eau distillée
- Ajouter 5 µl d'ADNc ou d'H₂O (blanc)

Cycle de Real Time PCR

- Dénaturation 5 min à 95°C
- Série de 40 cycles:
 - Dénaturation 15 sec à 95°C
 - Hybridation / élongation 1 min à 65°C

Analyse des résultats

L'analyse des résultats commence par la détermination des Ct (cycles seuils) qui s'obtiennent en fixant le seuil de détection dans la zone d'amplification exponentielle. Ce cycle seuil correspond au cycle auquel l'intensité de la fluorescence est significativement plus élevée que celle du bruit de fond. Ensuite, le Δ Ct de chaque condition est calculé pour chaque gène et ce, par la formule : Δ Ct = Ct de la condition contrôle - Ct de la condition de stress. Par après, on calcule l'efficacité E d'amplification pour chaque gène ($E = 10^{-1/\text{pente de la courbe standard}}$) ainsi que leur efficacité ^{Δ Ct} ou $E^{\Delta\text{Ct}}$ ($E^{\Delta\text{Ct}} = E$ propre au gène exposant Δ Ct). Enfin, on normalise les résultats en effectuant le ratio de chaque $E^{\Delta\text{Ct}}$ pour les gènes d'intérêts sur l' $E^{\Delta\text{Ct}}$ d'un gène de référence ($E^{\Delta\text{Ct}}$ du gène d'intérêt/ $E^{\Delta\text{Ct}}$ du gène de référence) (Pfaffl *et al.*, 2001).

VII. Hybridation sur damier à ADNc à basse densité

VII.1. Principe

Le micro damier à ADNc permet l'étude de l'expression d'une multitude de gènes dans différentes conditions. Dans le cadre de ce travail, nous avons travaillé avec la senechips, un damier à ADNc où sont spottés 240 trappeurs se rapportant à des gènes d'intérêt pour l'étude des stress et du vieillissement cellulaire (**tableau II.4**). On y retrouve également d'autres trappeurs qui serviront de contrôle d'hybridation ou à normaliser les résultats. Le design de ce damier a été réalisé de telle manière que chaque gène étudié y est représenté 3 fois, ce qui permet d'avoir, pour une seule hybridation, des triplicats de nos résultats (**figure II.6**). La liste des gènes représentés sur ce damier est fournie en annexe.

VII.2. Rétro-transcription

Lors de la transcription inverse, il y a incorporation de dCTP biotinylés afin que les ADNc produits puissent être détectables après leur hybridation à leurs trappeurs anticomplémentaires sur le micro-damier.

Matériel

- Mix standards internes (EAT, Belgium)
- Oligo dT (Invitrogen, USA)
- Tampon RT 5X (Invitrogen, USA)
- DTT 0,1 μ M (Invitrogen, USA)
- dATP, dCTP et dGTP 100 mM (Roche, Germany)
- dCTP 10 mM (Roche, Germany)
- dCTP biotinylés 1 mM (Roche, Germany)
- RNAsin (40 U/ μ l) (Promega, USA)
- Superscript RII (200 U/ μ l) (Invitrogen, USA)
- Ribonucléase H (RNase H) (2 U/ μ l) (Invitrogen, USA)
- Eau RNase free (Promega, USA)

Méthode

- Préparer le mix de RT et mélanger:
 - 2 μ l du mix de standard interne

Tableau II.4 : Liste des gènes représenter sur le damier à ADNc Senechips.

Row	Column	Gene symbol	Gene	General function
8	6	ELN	elastin	Matrice extracellulaire
8	7	EPC1	Enhancer of polycomb1	Cycle cellulaire/ duplication ADN
8	8	ISI	ISI	
8	9	EIFB	eIF4E-binding protein-beta	Métabolisme énergétique
8	10	boffer	(boffer) neg. cell (boffer)	
9	1	EWSR1	Fusing sarcoma breakpoint region1	Cycle cellulaire/ duplication ADN
9	2	F665	F665	Apoptose
9	3	FES	Feline sarcoma oncogene	Cycle cellulaire/ duplication ADN
9	4	FLG	flagrin	Differentiation (Kératinocyte)
9	5	FMOD	fibromodulin	Matrice extracellulaire
9	6	FNI	fibronectin	Matrice extracellulaire
9	7	GAPD	glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase	Métabolisme énergétique
9	8	boffer	(boffer) neg. cell (boffer)	
9	9	GAA	glucosidase-II precursor	Métabolisme énergétique
9	10	GADD153	DNA damage inducible transcript3	Régulation ADN
10	1	GLB1	Beta1-galactosidase	Differentiation (Kératinocyte)
10	2	GMC5F	Colony stimulating factor2	Système de défense
10	3	GTX	glutathione peroxidase	Système de défense
10	4	GRB2	Growth factor receptor-bound protein2	Système de défense
10	5	GSTP1	Glutathione S-transferase p1	Système de défense
10	6	GSTT1	Glutathione S-transferase theta1	Système de défense
10	7	H2BS	histone2b member B5 consensus	Système de défense
10	8	H4FM	histone4 member M1 consensus	Système de défense
10	9	boffer	(boffer) neg. cell (boffer)	
10	10	Hrb Crl-	Negative hrb CTL	Système de défense
11	1	HBE/GF	Heparin binding epidermal GF transcript	Système de défense
11	2	HIF1	Hypoxia inducible factor1	Système de défense
11	3	HMOX	heme-oxxygenase	Système de défense
11	4	HSP727	Heat shock 72KD protein1	Système de défense
11	5	HSP40	Heat shock 40KD protein1	Système de défense
11	6	HSP70	Heat shock 70KD protein1	Système de défense
11	7	HSP70B	Heat shock 70KD protein6	Système de défense
11	8	cyc	Cyclophilin 33A	Système de défense
11	9	HSP90-alpha	Heat shock 90KD protein1 alpha	Système de défense
11	10	ICAM-1	Intercellular adhesion molecule1	Matrice extracellulaire
12	1	ID1	Inhibitor of DNA binding1	Cycle cellulaire/ duplication ADN
12	2	ID2	Inhibitor of DNA binding2	Cycle cellulaire/ duplication ADN
12	3	IFNG	Interferon gamma	Cytokine
12	4	IGF1	Insulin like growth factor1	Facteur de croissance
12	5	IGF1R	Insulin like growth factor1 receptor	Facteur de croissance
12	6	IGFBP2	Insulin growth factor binding protein2	Facteur de croissance
12	7	IGFBP3	Insulin growth factor binding protein3	Facteur de croissance
12	8	IGFBP5	Insulin growth factor binding protein5	Facteur de croissance
12	9	IL10	Interleukin 10	Cytokine
12	10	IL11	Interleukin 11	Cytokine
13	1	boffer	(boffer) neg. cell (boffer)	
13	2	IL1JRA	Interleukin 11-receptor-alpha	Cytokine
13	3	ISI	ISI	Cytokine
13	4	IL12	Interleukin 12	Cytokine
13	5	IL15	Interleukin 15	Cytokine
13	6	GAPD	Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase	Cytokine
13	7	IL1A	Interleukin1 alpha	Cytokine
13	8	ISI	ISI	Cytokine
13	9	IL1B	Interleukin1 beta	Cytokine
13	10	boffer	(boffer) neg. cell (boffer)	
14	1	IL2	Interleukin 2	Cytokine
14	2	IL3	Interleukin 3	Cytokine
14	3	boffer	(boffer) neg. cell (boffer)	
14	4	IL4	Interleukin 4	Cytokine
14	5	IL6	Interleukin 6	Cytokine
14	6	IL8	Interleukin 8	Cytokine
14	7	INT6	Translation initiation factor3 subunit6	Cytokine
14	8	IWL	involution	Morphologie
14	9	JNK1	Mitogen activated protein kinase8	Differentiation (Kératinocyte)
14	10	JNK2	Mitogen activated protein kinase9	Système de défense
15	1	Hrb Crl-	Negative hrb CTL	Système de défense
15	2	JNKX1	Mitogen activated protein kinase kinase 4	Système de défense
15	3	JUND	Jun D proto-oncogene	Système de défense
15	4	K0-47	K0-47	Organisation chromosomique
15	5	KNSL5	mitotic-kinasin-like-protein1	Organisation chromosomique
15	6	KNSL6	mitotic-centromere-associated-kinasin	Differentiation (Kératinocyte)
15	7	KRT1	keratin1	Differentiation (Kératinocyte)
15	8	HK1	hexokinase 1	Differentiation (Kératinocyte)
15	9	KRT10	keratin10	Differentiation (Kératinocyte)
15	10	KRT14	keratin14	Differentiation (Kératinocyte)
16	1	KRT16	keratin16	Differentiation (Kératinocyte)

Row	Column	Gene symbol	Gene	General function
1	1	lyfz1	lyfz1	
1	2	lyfz1	lyfz1	
1	3	ADAM1	ADAM1	Matrix extracellular
1	4	ADPRT	ADPRT	Repairation ADN
1	5	ADPRT	ADPRT	
1	6	ANX1	ANX1	Differentiation (Keratinocyte)
1	7	AOP2	AOP2	Systeme de defense
1	8	AFOB	AFOB	
1	9	AFOB	AFOB	
1	10	APOE	APOE	Matrix extracellular
2	1	lyfz1	lyfz1	
2	2	APOJ	APOJ	Systeme de defense
2	3	AREG	AREG	Cycle cellulaire/ duplication ADN
2	4	ATM	ATM	Repairation ADN
2	5	BAT1	BAT1	Apoptose (+)
2	6	BAX	BAX	Apoptose (+)
2	7	BCL2	BCL2	Apoptose (-)
2	8	BCL2	BCL2	Apoptose (-)
2	9	BMP2	BMP2	Apoptose
2	10	BMP2	BMP2	Cycle cellulaire/ duplication ADN
3	1	CANX	CANX	Cycle cellulaire/ duplication ADN
3	2	CASP7	CASP7	Apoptose (+)
3	3	ISI	ISI	Apoptose (+)
3	4	CASP8	CASP8	Cycle cellulaire/ duplication ADN
3	5	CCNA1	CCNA1	Synthese pericentriole
3	6	CCNA1	CCNA1	Cycle cellulaire/ duplication ADN
3	7	CCNB1	CCNB1	Cycle cellulaire/ duplication ADN
3	8	ISI	ISI	Cycle cellulaire/ duplication ADN
3	9	CCND1	CCND1	Cycle cellulaire/ duplication ADN
3	10	CCND1	CCND1	Cycle cellulaire/ duplication ADN
4	1	CCND2	CCND2	Cycle cellulaire/ duplication ADN
4	2	CCND3	CCND3	Cycle cellulaire/ duplication ADN
4	3	lyfz1	lyfz1	
4	4	CCNE1	CCNE1	Cycle cellulaire/ duplication ADN
4	5	CENF	CENF	Apoptose
4	6	CENF	CENF	Apoptose
4	7	CENH	CENH	Morphologie
4	8	CDK4	CDK4	Cycle cellulaire/ duplication ADN
4	9	CDK4	CDK4	Cycle cellulaire/ duplication ADN
4	10	CDK4	CDK4	Cycle cellulaire/ duplication ADN
5	1	lyfz1	lyfz1	
5	2	CENP	CENP	Organisation chromosomique
5	3	CENP	CENP	Organisation chromosomique
5	4	CENP	CENP	Cycle cellulaire/ duplication ADN
5	5	CENP	CENP	Cycle cellulaire/ duplication ADN
5	6	CENP	CENP	Méiose/ meiose
5	7	CENP	CENP	Matrix extracellular
5	8	CENP	CENP	Glycylase
5	9	CENP	CENP	Matrix extracellular
5	10	CENP	CENP	Matrix extracellular
6	1	CXK1	CXK1	Inflammation
6	2	CXK2	CXK2	Inflammation
6	3	Tuba	Tuba	Morphologie
6	4	CROCIA	CROCIA	Cycle cellulaire/ duplication ADN
6	5	CST6	CST6	Matrix extracellular
6	6	CTGF	CTGF	Cycle cellulaire/ duplication ADN
6	7	CTSD	CTSD	Matrix extracellular
6	8	CTSD	CTSD	Matrix extracellular
6	9	CTSD	CTSD	Matrix extracellular
6	10	CTSD	CTSD	Matrix extracellular
7	1	CYT2A	CYT2A	Differentiation (Keratinocyte)
7	2	DHFR	DHFR	Cycle cellulaire/ duplication ADN
7	3	DPT	DPT	Matrix extracellular
7	4	DSG1	DSG1	Matrix extracellular
7	5	E2F1	E2F1	Differentiation (Keratinocyte)
7	6	E2F5	E2F5	Cycle cellulaire/ duplication ADN
7	7	E2F5	E2F5	Cycle cellulaire/ duplication ADN
7	8	E2F5	E2F5	Cycle cellulaire/ duplication ADN
7	9	E2F5	E2F5	Cycle cellulaire/ duplication ADN
7	10	E2F5	E2F5	Cycle cellulaire/ duplication ADN
8	1	lyfz1	lyfz1	
8	2	EGR2	EGR2	Systeme de defense
8	3	EGR3	EGR3	Cycle cellulaire/ duplication ADN
8	4	EGR3	EGR3	Systeme de defense
8	5	EGR3	EGR3	Systeme de defense
8	6	EGR3	EGR3	Systeme de defense
8	7	EGR3	EGR3	Systeme de defense
8	8	EGR3	EGR3	Systeme de defense
8	9	EGR3	EGR3	Systeme de defense
8	10	EGR3	EGR3	Systeme de defense

Row	Column	Gene symbol	Gene	General function
16	2	KRT17	Keratin17	Differentiation (Keratinocyte)
16	3	HIF1T	Hypoxia-inducible phosphatidylinositol transferase 1	Hesck-Körping gene
16	4	KRT19	Keratin19	Differentiation (Keratinocyte)
16	5	KRT6A	Keratin6	Differentiation (Keratinocyte)
16	6	L6	Transmembrane 4 superfamily member1	
16	7	MAP17	Membrane associated protein17	
16	8	MAX	MAX protein	
16	9	MCM2	MCM2	
16	10	MDM2	MDM2	
17	1	MEK1	Minigen activated protein kinase kinase1	Cycle cellulaire/ duplication ADN
17	2	MEK2	Minigen activated protein kinase kinase2	Réparation ADN
17	3	MMP1	Matrix metalloproteinase 1	Cycle cellulaire/ duplication ADN
17	4	MMP10	matrix metalloproteinase 10	Cycle cellulaire/ duplication ADN
17	5	MMP11	matrix metalloproteinase 11	Matrix extracellulaire (Dégradation)
17	6	MMP12	matrix metalloproteinase 12	Matrix extracellulaire (Dégradation)
17	7	MMP13	matrix metalloproteinase 13	Matrix extracellulaire (Dégradation)
17	8	MMP14	matrix metalloproteinase 14	Matrix extracellulaire (Dégradation)
17	9	MMP15	matrix metalloproteinase 15	Matrix extracellulaire (Dégradation)
17	10	MMP2	matrix metalloproteinase 2	Matrix extracellulaire (Dégradation)
18	1	buffer	(Detection neg. cell (buffer))	
18	2	MMP3	matrix metalloproteinase 3	Matrix extracellulaire (Dégradation)
18	3	ISS	ISS	Matrix extracellulaire (Dégradation)
18	4	MMP7	matrix metalloproteinase 7	Matrix extracellulaire (Dégradation)
18	5	MDH	Malic déhydrogénase 1	Hesck-Körping gene
18	6	MPI	Metalloproteinase1	Matrix extracellulaire (Dégradation)
18	7	MSRA	methionine-sulfonide-reductase A peptide	Réparation protéines
18	8	IS2	IS2	Système de défense
18	9	MT2A	metallothionein 2A	
18	10	buffer	(Detection neg. cell (buffer))	
19	1	MYK	myosin-like kinase	Cycle cellulaire/ duplication ADN
19	2	MYBL2	b-myb	Cycle cellulaire/ duplication ADN
19	3	MYC	c-myc	Cycle cellulaire/ duplication ADN
19	4	NCK1	NCK adapter protein1	Cycle cellulaire/ duplication ADN
19	5	NF1	neurofibromin1	Système de défense
19	6	NGFR	nerve growth factor receptor	
19	7	NRG1	neuregulin	
19	8	buffer	(Detection neg. cell (buffer))	
19	9	ODC	Oxidative decarboxylase1	Cycle cellulaire/ duplication ADN
19	10	OPG	osteoprotegerin	Matrix extracellulaire
20	1	OPN	osteonectin	Migration
20	2	Oste	osteonectin	Matrix extracellulaire
20	3	p16	Cyclin dependent kinase inhibitor 2A	Cycle cellulaire (-)
20	4	p21	Cyclin dependent kinase inhibitor 1A	Cycle cellulaire (-)
20	5	p27	Cyclin dependent kinase inhibitor 1B	Cycle cellulaire (-)
20	6	p35	CDK 5 regulatory subunit1	Cycle cellulaire (-)
20	7	p53	Tumor protein p53	Cycle cellulaire (-)
20	8	p57	Cyclin dependent kinase inhibitor 1C	Cycle cellulaire (-)
20	9	PAI1	plasminogen activator inhibitor type1	Matrix extracellulaire
20	10	Hyb Cbl -	Negative hyb C.T.L.	
21	1	PAI2	plasminogen activator inhibitor type2/urokinase inhibitor	Matrix extracellulaire
21	2	PAK	P21 activated kinase1	Morphologie
21	3	PCNA	Proliferating cell nuclear antigen	Cycle cellulaire/ duplication ADN
21	4	PKM2	pyruvate-kinase-muscle	Metabolisme énergétique
21	5	PLAU	urokinase	
21	6	PLAUR	urokinase-receptor	
21	7	PLK	Polo-like kinase	Cycle cellulaire/ duplication ADN
21	8	PLA2	Phospholipase A2	Hesck-Körping gene
21	9	POLA2	Polymerase alpha	Cycle cellulaire/ duplication ADN
21	10	PRSS11	Protease serine11	
22	1	PSMA2	proteasome subunit, alpha type, 2	Dégradation protéique
22	2	PSMA3	proteasome subunit, alpha type, 3	Dégradation protéique
22	3	PSMC6	proteasome 26S subunit, non-ATPase, 6	Dégradation protéique
22	4	PSMD1	proteasome 26S subunit, non-ATPase, 1	Dégradation protéique
22	5	PSMD11	proteasome 26S subunit, non-ATPase, 11	Dégradation protéique
22	6	PSMD12	proteasome 26S subunit, non-ATPase, 12	Dégradation protéique
22	7	PSORI	psoriasis	
22	8	RAF1	c-rat1	Cycle cellulaire/ duplication ADN
22	9	RANTES	Small inducible cytokine A5	
23	1	buffer	(Detection neg. cell (buffer))	
23	2	RET	ret protooncogene	Cycle cellulaire (-)
23	3	IS3	IS3	Cycle cellulaire duplication ADN
23	4	RORI	R.A.R related orphan receptorA	Cycle cellulaire duplication ADN
23	5	RPL3	60S-ribosomal-proteinL3	

Row	Column	Gene symbol	Gene	General function
23	6	SP	ribosomal-protein S10	Système protéique
23	7	RPS10	ribosomal-protein S10	
23	8	IS6	IS6	Cycle cellulaire/ duplication ADN
23	9	RRAS	R-ras	Cycle cellulaire/ duplication ADN
23	10	buffer	(Detection neg. cell (buffer))	
24	1	RRM1	ribonucleotide-reductase M1	Cycle cellulaire/ duplication ADN
24	2	SIH0A10	Calpastatin	Dégradation (Keratinocyte)
24	3	buffer	(Detection neg. cell (buffer))	
24	4	SIH0A11	Calpastatin	Dégradation (Keratinocyte)
24	5	SIH0A8	Calpastatin	Inflammation
24	6	SHC	SHC transforming protein1	Apoptose
24	7	SLK	Src-20-related serine-threonine kinase	Apoptose
24	8	SLP2	Stomatitis like protein2	Développement muscle
24	9	SM22	transgelin	Morphologie
24	10	SMAD1	Modulator against decapentaplegic homolog1	
25	1	Hyb Cbl -	Negative hyb C.T.L.	
25	2	SNCG	synectin	Cycle cellulaire/ duplication ADN
25	3	SDS	Serine Dehydratase	Hesck-Körping gene
25	4	SOD2	Superoxide dismutase2	Système de défense
25	5	SPR21B	coradin	Dégradation (Keratinocyte)
25	6	SKI	signal transducer and activator of transcription 5A	Système de défense
25	7	STAT1S	Thromboxane-A2-receptor	Cycle cellulaire/ duplication ADN
25	8	TRXAR	thioredoxin-reductase	Cycle cellulaire/ duplication ADN
25	9	TERT	telomerase-RNA	Cycle cellulaire/ duplication ADN
25	10	buffer	(Detection neg. cell (buffer))	
26	1	TFAP2A	Transcription factor AP2-alpha	Cycle cellulaire/ duplication ADN
26	2	TFAP2B	Transcription factor AP2-beta	Cycle cellulaire/ duplication ADN
26	3	TFAP2C	Transcription factor AP2-gamma	Cycle cellulaire/ duplication ADN
26	4	TGFA	TGF-alpha	Facteur de croissance
26	5	TGFB1	TGF-beta1	Facteur de croissance
26	6	TGFB2	TGF-beta2	Facteur de croissance
26	7	TGMI	transglutaminase1	Facteur de croissance
26	8	TH	Thymidine-hydroxylase	Facteur de croissance
26	9	THBS1	Thrombospondin	Facteur de croissance
26	10	buffer	(Detection neg. cell (buffer))	
27	1	TIMP2	Tissue inhibitor of metalloproteinase2	Matrix extracellulaire
27	2	TK1	thymidine-kinase	Matrix extracellulaire
27	3	IS6	IS6	Cycle cellulaire/ duplication ADN
27	4	TNFA	tumor necrosis factor alpha	Apoptose/inflammation
27	5	TNFR	Tumor necrosis factor receptor	Hesck-Körping gene
27	6	TNFB	tumor necrosis factor beta	Apoptose/inflammation
27	7	TNFRSF1A	TNF-alpha-R1	Apoptose/inflammation
27	8	IS3	IS3	Apoptose/inflammation
27	9	TNFRSF1B	TNF-alpha-R2	Apoptose/inflammation
27	10	buffer	(Detection neg. cell (buffer))	
28	1	Hyb Cbl -	Negative hyb C.T.L.	
28	2	buffer	(Detection neg. cell (buffer))	
28	3	TOP2A	topoisomerase2-alpha	Cycle cellulaire/ duplication ADN
28	4	TPA	Thrombinogen activator tissue	Matrix extracellulaire
28	5	TYMS	Thymidine repeat binding factor1	Cycle cellulaire/ duplication ADN
28	6	UBC3C	ubiquitin-conjugating enzyme E2Cubiquitin carrier	Dégradation protéique
28	7	buffer	(Detection neg. cell (buffer))	
28	8	VEGFC	Vascular endothelial growth factor C	Cycle cellulaire/ duplication ADN
28	9	VEGFR1	Vascular endothelial growth factor receptor1	Cycle cellulaire/ duplication ADN
29	1	buffer	(Detection neg. cell (buffer))	
29	2	buffer	(Detection neg. cell (buffer))	
29	3	buffer	(Detection neg. cell (buffer))	
29	4	1 cell +	Positive detection cell	
29	5	2 cell +	Positive detection cell	
29	6	3 cell +	Positive detection cell	
29	7	4 cell +	Positive detection cell	
29	8	5 cell +	Positive detection cell	
29	9	6 cell +	Positive detection cell	
29	10	7 cell +	Positive detection cell	
30	1	8 cell +	Positive detection cell	
30	2	9 cell +	Positive detection cell	
30	3	10 cell +	Positive detection cell	
30	4	11 cell +	Positive detection cell	
30	5	buffer	(Detection neg. cell (buffer))	
30	6	buffer	(Detection neg. cell (buffer))	
30	7	buffer	(Detection neg. cell (buffer))	
30	8	buffer	(Detection neg. cell (buffer))	
30	9	buffer	(Detection neg. cell (buffer))	
30	10	buffer	(Detection neg. cell (buffer))	

SeneChips (240 genes)

Characteristic:

- 3 pins →
- 3 replicates/capture probes
- 30x30=900 spots (=> 300 samples)
- 13,5 X 13,5 mm

- =Positive Hybridization Control
- =Negative Hybridization Control
- =Negative Detection Control
- =HouseKeeping gene
- =Internal Standar

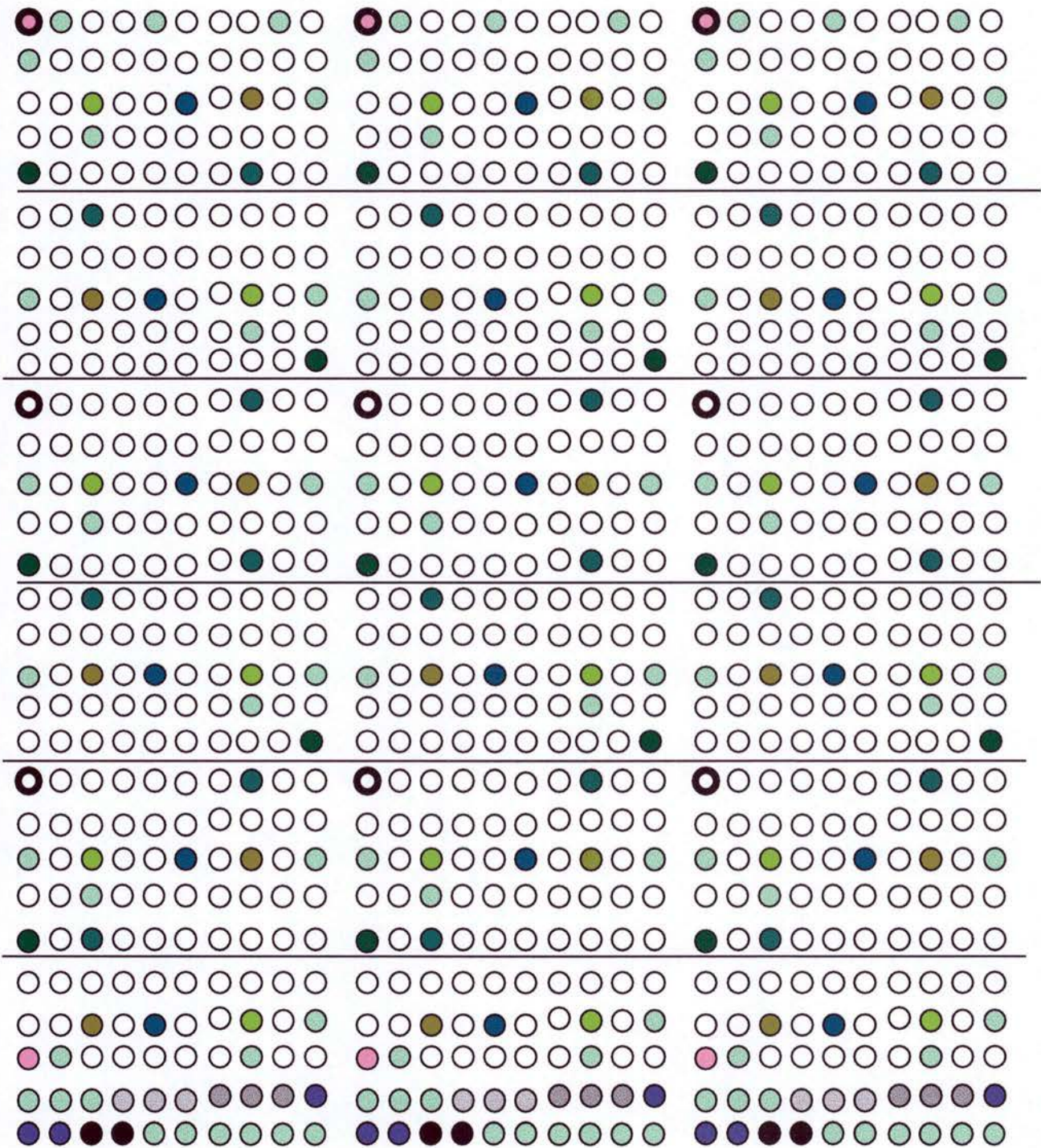


Figure II.6 : Design de la senechips

- 2 μ l d'Oligo dT
- 10 μ g d'ARN total
- Eau Rnase free pour obtenir un volume final de 9.5 μ l

- Incuber le mix de RT 10 min à 70°C et mélanger
- Incuber directement sur glace pendant 5 min et mélanger
- Préparer le mix de dNTP:
 - 4 μ l dATP
 - 4 μ l dTTP
 - 4 μ l dGTP
 - 6,4 μ l dCTP
 - 64 μ l dCTP biotinylé
- Préparer le mix de réaction:
 - 4 μ l de tampon RT 5x
 - 2 μ l DTT 0,1M
 - 1 μ l Rnasin
 - 2 μ l du mix dNTP
- Ajouter 9 μ l du mix de réaction par échantillon et incuber 5 min à température ambiante
- Ajouter 1,5 μ l /tube de SuperScript RII et incuber 1h30 à 42°C (Répéter l'opération 2x)
- Stopper la réaction 15 min à 70°C
- Ajouter 1 μ l /tube de RNase H et incuber 20 min à 37°C
- Dénaturer la RNase H en la mettant à 95°C pendant 3 min et congeler à -20°C

VII.3. Hybridation sur damier

Les ADN cibles biotinylés issus de la transcription inverse sont mélangés à une solution d'hybridation et injectés dans des chambres d'hybridation. Les lames sont alors placées dans un thermomixeur pendant toute une nuit durant laquelle les ADN cibles s'hybrident spécifiquement à leur trappeur anticcomplémentaire. Après l'hybridation, les lames sont lavées avec une solution Unibuffer 0,1x + Tween 0.1 % afin d'éliminer les ADN cibles ne s'étant pas appariés.

Matériel

- Lames de verre spottées: Senechips (EAT, Belgium)
- Hybri Buffer A et Hybri Buffer B (EAT, Belgium)
- Uni Buffer dilué 4 fois (EAT, Belgium)
- Tween 20 (Sigma, USA)
- Thermomixeur (Eppendorf, Germany)
- ADN cible pour le contrôle positif 50 nM
- Lait en poudre Gloria 10 mg (Nestlé, Swiss)
- Anticorps conjugué antibiotinecyanine3 (Lucron Bioproduct, USA)

Méthode

Hybridation :

- Préparer un mix d'hybridation :
 - 10 μ l d'hybri Buffer A
 - 20 μ l de produit RT
 - 10 μ l de contrôle positif

- 20 µl H₂O
- 40 µl Hybri Buffer B
- Injecter la solution d'hybridation dans la chambre d'hybridation
- Mettre les lames dans un thermomixeur à 1400 rpm, à 60°C, overnight

Lavage :

- Retirer les chambres d'hybridation et laver les lames 4 fois 2 min avec l'Unibuffer 0,1 x + tween 0,1 %

Détection :

- Mettre les lames 45 min dans une solution d'Unibuffer 1x + antibiotinecyanine3 (dilution 10000 fois)
- Laver les lames 5 fois 2 min avec l'Unibuffer 0,1x + tween 0,1 %
- Centrifuger 5 min à 600 rpm afin de sécher les lames

Quantification des damiers

Les lames sont scannées à l'aide d'un scanner confocal à différents gains (100,70 et 50) au moyen du programme ScanArray Express (Perkin Elmer) et les images obtenues sont enregistrées sous un format TIFF 16 bits. En scannant à différents gains, nous pourrions analyser à la fois les gènes fortement et faiblement exprimés. Le fluorochrome est excité à une longueur d'onde de 515 nm et émet de la lumière à 555 nm. Les différents spots du damier possèdent une intensité qui est proportionnelle à la quantité de cibles hybridées. Les images sont ensuite quantifiées avec le programme Imagen 4.2 (Biodiscovery) et les résultats traités sur Excel dans le template « Senechip » (EAT). Le traitement repose sur une normalisation d'abord par rapport aux standards internes, et ensuite par rapport aux gènes de maintenance, dont l'expression reste, en principe, stable dans les différentes conditions de stress utilisées.

Résultats et Discussion

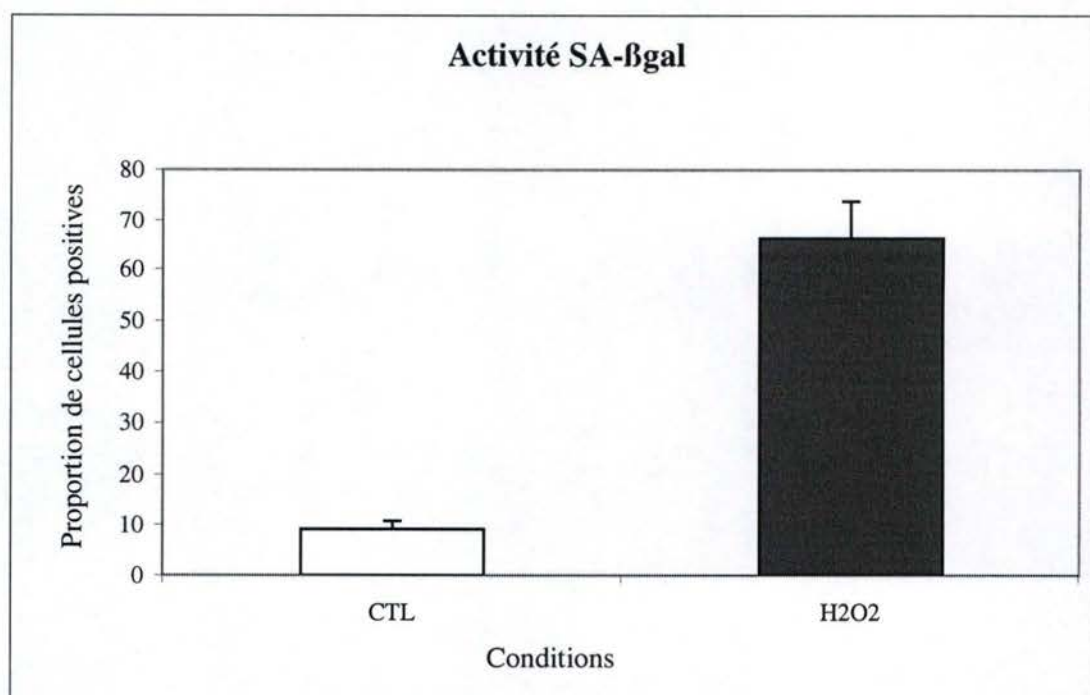


Figure III-1 : Etude de l'activité β -galactosidase associée à la sénescence chez des fibroblastes IMR-90 hTERT.

Lors de ce mémoire, nos travaux se sont portés sur un modèle de sénescence induite prématurément par des stress subcytotoxiques sous H_2O_2 sur des fibroblastes de poumons fœtaux humains IMR-90 immortalisés par la sous unité h-TERT de la télomérase.

Le modèle que nous avons utilisé dans le cadre de cette étude est basé sur un stress à une concentration de 200 μM pendant deux heures (cfr matériel et méthodes).

Plusieurs biomarqueurs du vieillissement ont été analysés lors de ce travail. Tout d'abord, nous avons étudié l'activité de la β -galactosidase associée à la sénescence. Nous avons également estimé la capacité proliférative par un test d'incorporation de la [3H]-thymidine dans l'ADN ainsi que par l'étude du niveau protéique de p21^{WAF-1} par Western Blot.

Une fois ce modèle validé, nous nous sommes attardés sur le gène de la cyclooxygénase 2 et à la voie de transduction du signal permettant son expression. Des études par Western-blot nous ont permis de vérifier les variations d'expression au niveau protéique de COX-2 et d'autres protéines pouvant intervenir dans son expression.

Nous avons également réalisé une étude transcriptomique par l'utilisation d'un damier à ADN afin de caractériser de façon plus générale le phénotype de sénescence prématurée observé dans ce modèle. Afin de valider les résultats obtenus suite à l'analyse du damier à ADN, nous avons sélectionné certains gènes pour une validation en Real Time RT PCR.

I. Etude des biomarqueurs de la sénescence

1. Activité de la β -galactosidase associée à la sénescence (SA β -Gal)

L'activité de la SA β -Gal a été mise en évidence par l'équipe de Dimri (Dimri *et al.*, 1995). L'activité de cette enzyme spécifique à la sénescence est facilement détectable par un test histochimique en incubant les cellules préalablement fixées avec du X-Gal, substrat de la réaction enzymatique à pH 6.

Nous constatons que la proportion de cellules positives augmente de l'ordre de 7 fois entre les cellules contrôles et les cellules stressées sous H_2O_2 72 heures après le stress (**Figure III.1**). Ces résultats correspondent à ceux obtenus pour d'autres souches de fibroblastes stressés telles que les fibroblastes WI-38 (Dumont *et al.*, 2000).

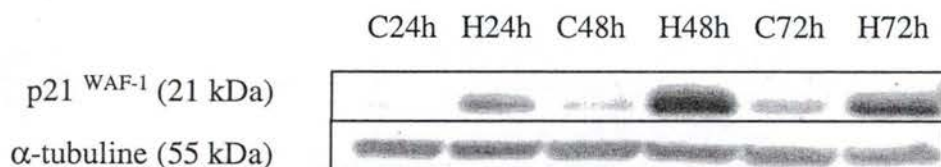
2. Etude de la capacité de prolifération

Une des caractéristiques principales des cellules sénescents est leur arrêt irréversible du cycle cellulaire. Afin d'étudier la capacité proliférative de nos cellules, nous avons réalisé d'une part, un test d'incorporation de la [3H]-thymidine, d'autre part, nous nous sommes intéressés au niveau protéique d'un inhibiteur du cycle cellulaire, p21^{WAF1}.

a) Incorporation de [3H]-thymidine

Ce test nous a permis de mettre en évidence une diminution de 10 fois d'incorporation de [3H]-thymidine entre les cellules contrôles et les cellules stressées sous 200 μM H_2O_2 72 heures après le stress. Ces résultats suggèrent une forte diminution de la synthèse d'ADN chez les cellules stressées et confirment donc l'arrêt prolifératif caractérisant les cellules en SIPS (**Figure III.2**).

A.



B.

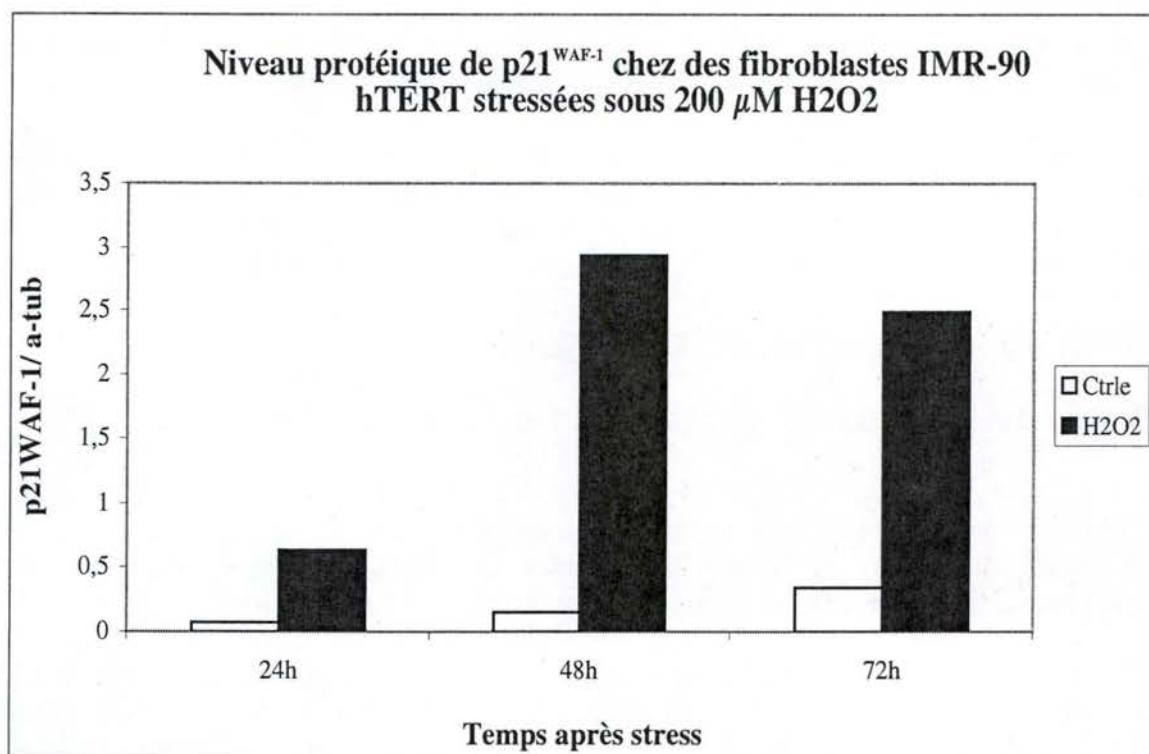


Figure III-3:

A : Autoradiographies de différentes bandes obtenues par Western-blot à partir de 25 μ g de protéines totales.

B : Analyse du niveau protéique de p21^{WAF-1} par Western-blot, chez des FHDs IMR-90 hTERT stressées sous 200 μ M H₂O₂ durant 2 heures. Les résultats sont normalisés en utilisant l' α -tubuline comme référence.

Colonnes blanches: Cellules contrôles non stressées.

Colonnes noires: Cellules stressées.

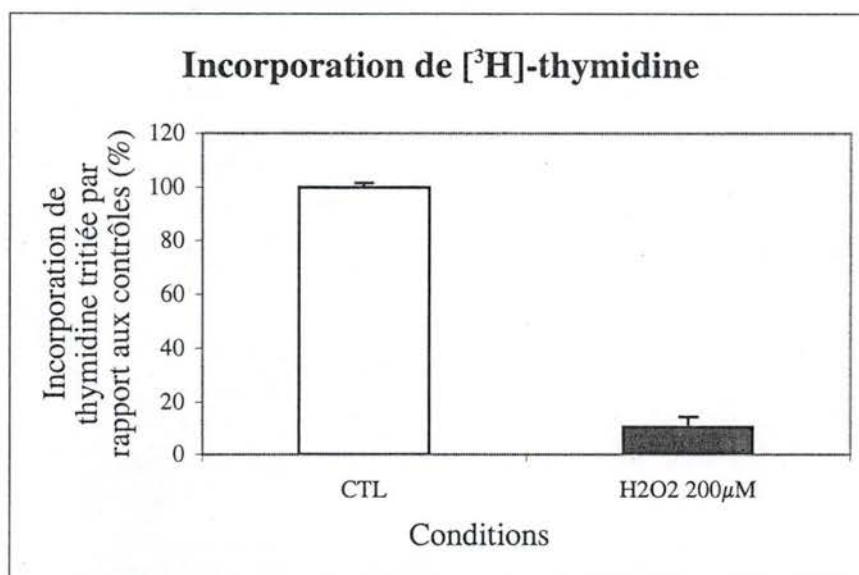


Figure III-2 : Estimation de la capacité de prolifération des fibroblastes IMR-90 hTERT soumis ou non à un stress sous H_2O_2 . Les valeurs de radioactivité ont été normalisées en les divisant par la quantité de protéines cellulaires obtenue par un dosage au folin et ont été exprimées en pourcentage par rapport à la valeur obtenue chez les cellules contrôles.

b) Etude du niveau protéique de $\text{p}21^{\text{WAF-1}}$

Nous nous sommes ensuite intéressés à la CDKI $\text{p}21^{\text{WAF-1}}$, une protéine inhibitrice importante du cycle cellulaire. Nous avons analysé son niveau protéique par Western-blot à différents temps après que les fibroblastes IMR-90 hTERT aient été soumis à un stress sous H_2O_2 . De manière générale, nous pouvons constater une augmentation de la quantité de $\text{p}21^{\text{WAF-1}}$ chez les cellules stressées par rapport aux cellules contrôles et ce, dès les 24 premières heures suivant le stress. Cette augmentation du niveau protéique de cet inhibiteur du cycle cellulaire peut être mise en relation avec la diminution de potentiel prolifératif observée par le test d'incorporation de la $[^3\text{H}]$ -thymidine (**Figure III.3**).

II. Etude de la cyclooxygénase 2 (COX-2) chez les IMR-90 hTERT en SIPS induite sous H_2O_2 .

Dans le cadre de ce mémoire, nous nous sommes intéressés aux variations d'expression de COX-2 chez les fibroblastes IMR-90 hTERT lors de la SIPS induite sous H_2O_2 . En effet, des travaux récents du groupe de Vandebunder (Institut Pasteur, Lille) montrent que la surexpression de COX-2 entraînant une production de radicaux libres. De plus, ces cellules entrent dans un état de sénescence prématurée.

Les cyclooxygénases sont des enzymes jouant un rôle important dans l'inflammation et la carcinogenèse. A ce jour, 2 isoformes de la cyclooxygénase ont été décrites : la COX-1, exprimée de manière constitutive dans la plupart des tissus et COX-2 qui est facilement induite dans une variété de types cellulaires par des stimuli tels que les lipopolysaccharides ou par des cytokines et n'est donc exprimée qu'en condition inflammatoire. Au delà de son implication dans le processus inflammatoire, COX-2 intervient également au niveau de la

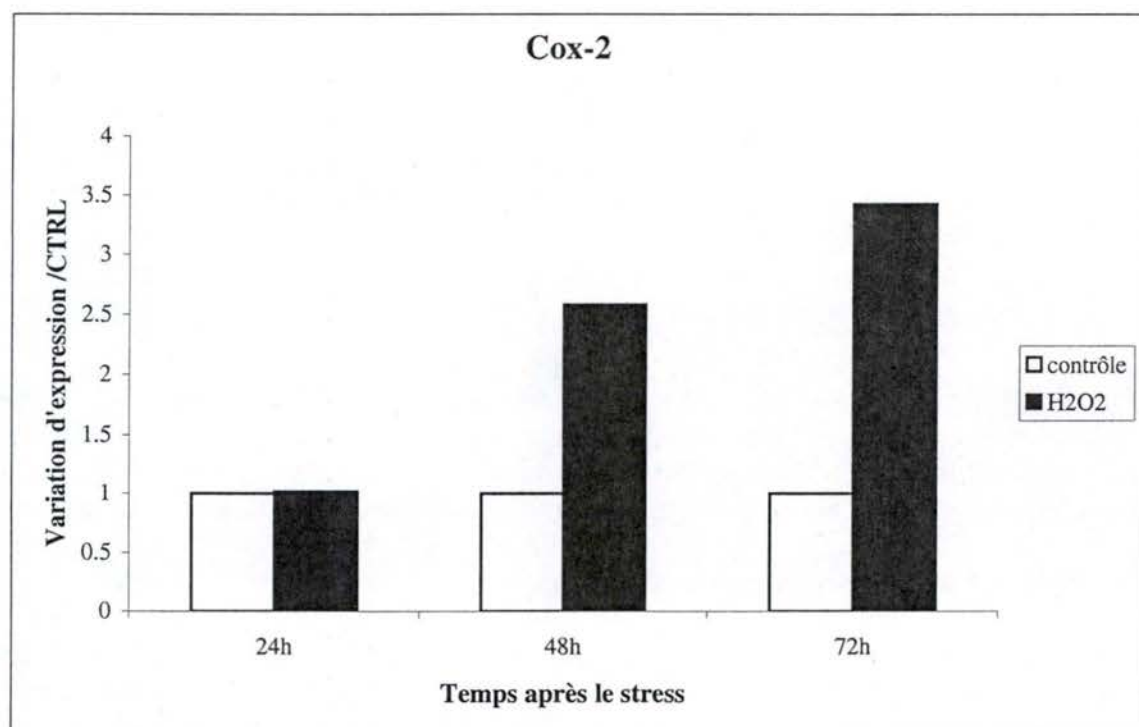


Figure III-4: Niveau relatif d'ARNm de la cyclooxygénase 2 étudié par Real Time RT-PCR. Nous avons réalisés cette étude chez des fibroblastes contrôle et des cellules stressées sous 200 μM d' H_2O_2 durant deux heures. Cette étude fut réalisée à partir d'ARN total extrait à 24, 48 et 72 heures après le stress. Les résultats ont été normalisés par rapport aux gènes de référence GAPDH et de RPL13.

Colonnes blanches: Cellules contrôles non stressées.

Colonnes noires: Cellules stressées.

régulation du cycle cellulaire ainsi qu'au niveau du processus apoptotique qui sont des phénomènes intervenant chez les cellules en SIPS.

1. Etude de l'expression de COX-2 dans notre modèle

a) Niveau d'ARNm

L'analyse de l'expression de COX-2 a d'abord été réalisée par Real Time RT-PCR. Nous avons réalisé des extractions d'ARN total à partir de cellules contrôles et stressées sous H_2O_2 , à 24, 48 et 72 heures après le stress. Ensuite, 2 μ g d'ARN total ont été rétrotranscrits. Les ADNc ainsi obtenus ont permis d'effectuer la PCR en temps réel. Les résultats montrent une augmentation de la quantité d'ARNm de COX-2 visible dès 48 heures après le stress. En effet, le niveau relatif de transcrits de COX-2 est augmenté de 2,5 et 3,4 fois chez les cellules en SIPS respectivement à 48 et 72 heures après le stress. Il semble donc que les fibroblastes IMR-90 hTERT surexpriment la cyclooxygénase 2 suite à un stress sous H_2O_2 (**Figure III.4**).

b) Niveau protéique

Nous avons vérifié si la surexpression de COX-2 observée au niveau de l'ARNm, se retrouvait au niveau protéique. Nous avons analysé le niveau protéique de COX-2 par la technique du Western Bot à différents temps après que les fibroblastes IMR-90 hTERT aient été soumis à un stress subcytotoxique sous H_2O_2 . Nous observons une augmentation de la quantité de la cyclooxygénase 2 et ce, dès les 24 premières heures suivant le stress (**Figure III.5**). Ces résultats sont concordants avec ceux qui sont obtenus par la technique de Real Time RT-PCR pour les temps 48 et 72 heures après stress. Remarquons toutefois qu'aucun changement d'expression de COX-2 n'a été mis en évidence par la technique de Real Time RT-PCR à 24 heures après les stress. On peut supposer que cette augmentation du niveau protéique de COX-2 observée 24 heures après le stress soit due à une stabilisation de son ARNm ou de sa protéine plutôt qu'à une augmentation de sa transcription. Quoiqu'il en soit, nous observons une surexpression de COX-2 autant au niveau de son ARNm qu'au niveau protéique dans notre modèle de SIPS induite par H_2O_2 .

2. Etude des voies de transduction du signal impliquées dans la surexpression de COX-2

a) Etude de l'activité de liaison de divers facteurs de transcription

Afin de déterminer la ou les voies de transduction du signal pouvant être responsable de la surexpression de COX-2, nous nous sommes penchés sur les différents éléments de régulation transcriptionnel de son promoteur (**Figure III.6**).

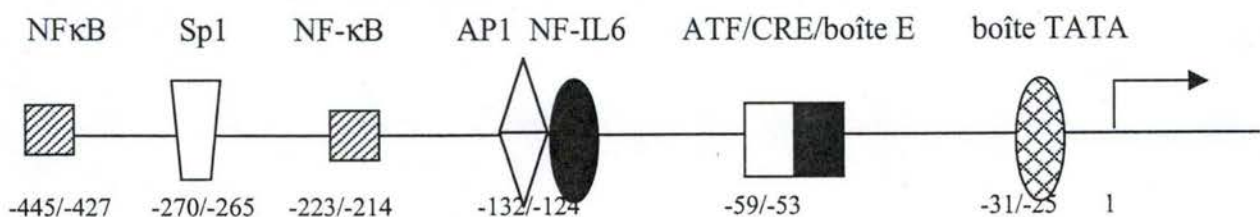
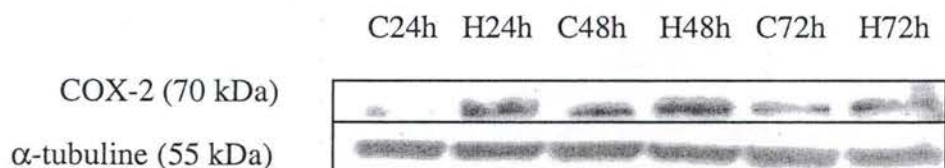


Figure III-6 : Eléments principaux de régulation dans le promoteur du gène humain COX-2.

A.



B.

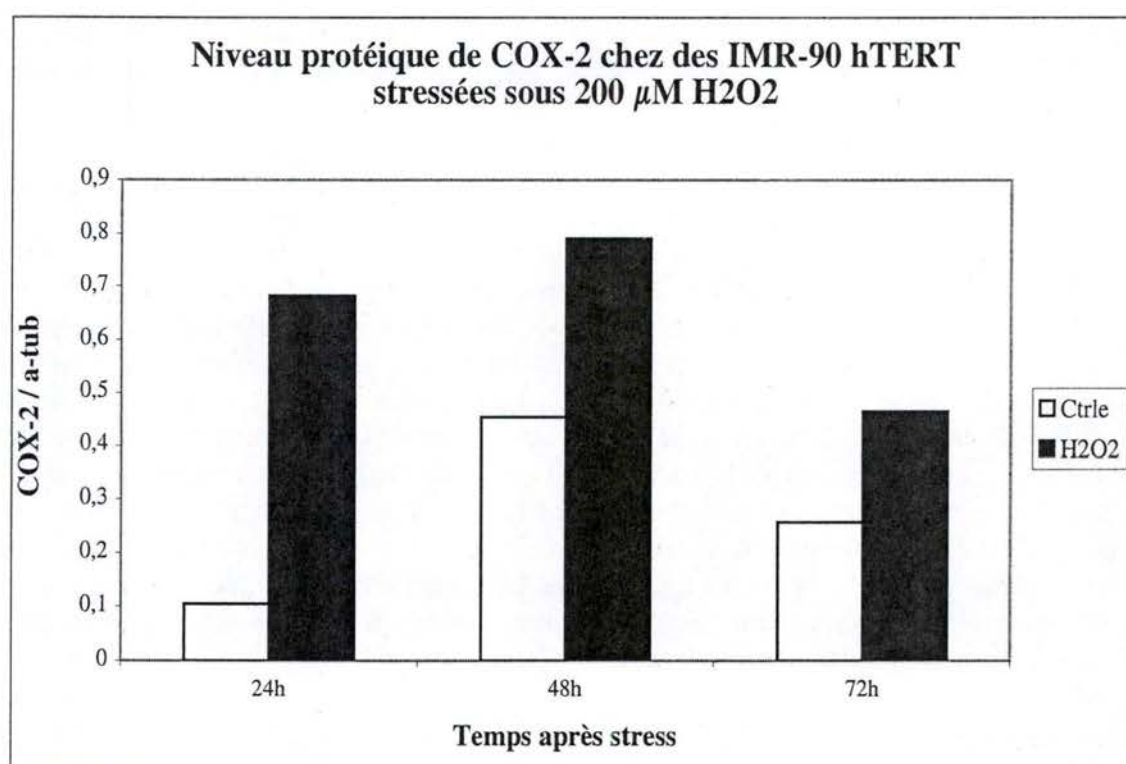


Figure III-5 :

A : Autoradiographies de différentes bandes obtenues par Western-blot à partir de 25 μ g de protéines totales.

B : Analyse du niveau protéique de la COX-2 par Western-blot, chez des FHDs IMR-90 hTERT stressées sous 200 μ M H₂O₂ durant 2 heures. Les résultats sont normalisés en utilisant l' α -tubuline comme référence.

Colonnes blanches: Cellules contrôles non stressées.

Colonnes noires: Cellules stressées.

Nous avons, dans un premier temps, étudié l'activité de liaison à l'ADN de plusieurs facteurs de transcription suite à un stress sous H_2O_2 par une technique colorimétrique. Parmi ceux-ci, nous nous sommes intéressés à AP1, ATF-2, NF κ B, SP1 et CREB. Outre le fait que ces facteurs de transcription possèdent un ou plusieurs sites de liaison au niveau du promoteur de COX-2, ceux-ci sont également impliqués, de près ou de loin, dans la problématique de la sénescence répllicative et de la SIPS.

AP1 est un facteur hétérodimérique constitué des protéines JUN et FOS. Ce facteur de transcription joue un rôle important dans la réponse de la cellule aux agressions externes ainsi que dans le contrôle de la prolifération cellulaire. De plus, Adderley et son équipe ont montré que la MAP kinase ERK était activée chez des cardiomyocytes stressés sous H_2O_2 et que celle-ci était responsable de l'activation du facteur de transcription AP1, ce qui conduisait à la surexpression de la COX-2 (Adderley *et al.*, 1999).

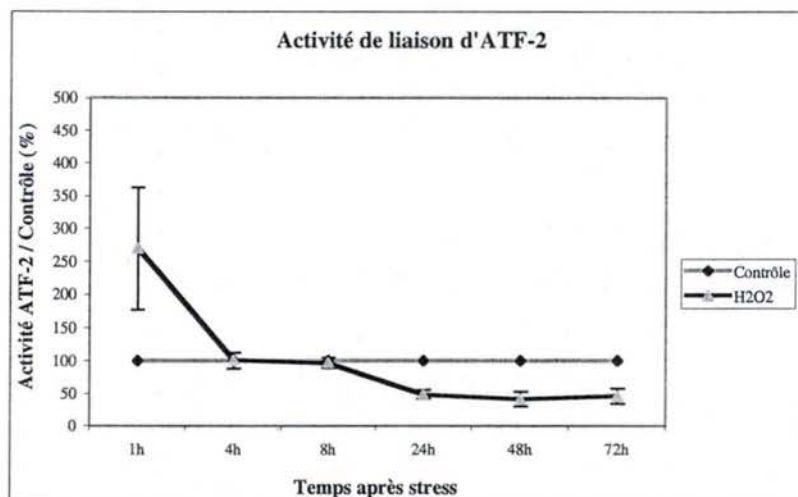
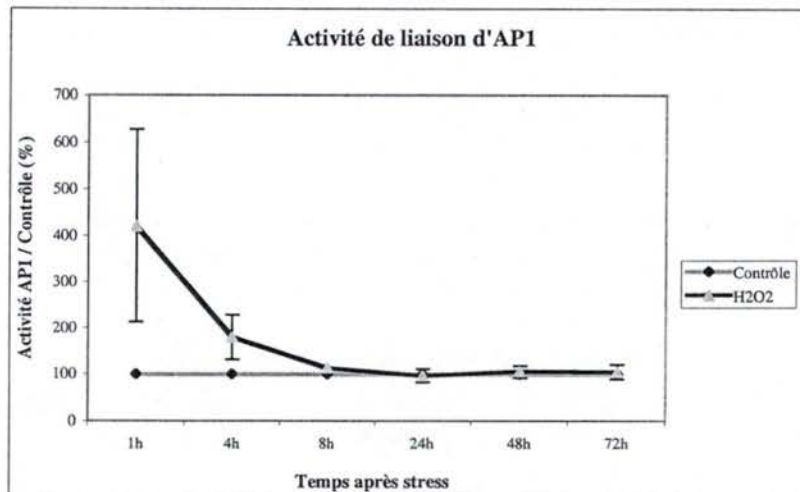
Le facteur de transcription **ATF-2** est, quant à lui, connu pour être activé suite à un stress sous H_2O_2 chez les fibroblastes IMR-90. Il est capable de s'associer avec la forme hypophosphorylée de la protéine Rb, et serait responsable de l'apparition des biomarqueurs de la sénescence (Frippiat *et al.*, 2002).

NF κ B est un facteur de transcription hétérodimérique qui est séquestré dans le cytoplasme par des protéines de la famille I κ B (pour revue : Karin 1999). La phosphorylation de I κ B permet son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome. La dégradation de I κ B libère NF κ B qui est alors transloqué dans le noyau et qui active des gènes cibles: ceux-ci sont impliqués dans l'inflammation, la réponse aux stress, le cycle cellulaire et l'apoptose (Josselin *et al.*, 2003). En outre, NF κ B est également connu pour activer la transcription de la cyclooxygénase 2 chez des fibroblastes traités avec l'interleukine 1 ou au TNF- α (Yan *et al.*, 2002 ; Nakao *et al.*, 2002).

Enfin, les facteurs de transcriptions **SP1** et **CREB** voient leur activité fortement chuter chez les fibroblastes lors de la sénescence répllicative (Chin *et al.*, 1996 ; Helenius *et al.*, 1996).

Afin d'étudier l'activité de liaison de ces différents facteurs de transcription, nous avons réalisé des extractions de protéines nucléaires à différents temps après que les fibroblastes IMR-90 hTERT aient été stressés sous 200 μ M d' H_2O_2 durant deux heures. Ensuite, ces extraits ont été déposés dans des puits au fond desquels est fixée la séquence d'ADN consensus du facteur de transcription d'intérêt. L'ajout d'un anticorps primaire spécifique au facteur de transcription étudié et ensuite l'ajout d'un anticorps secondaire couplé à une peroxydase permet de déterminer la quantité de facteur de transcription lié à sa séquence consensus.

Les résultats du test colorimétrique concernant ATF-2 et AP1 indiquent une augmentation de leur activité de liaison chez les cellules stressées sous H_2O_2 par rapport aux cellules contrôles et ce jusqu'à 4 heures et 8 heures après le stress respectivement. De 8 à 72 heures après le stress, l'activité de liaison de ces facteurs ne varie pas ou diminue par rapport aux cellules contrôles. Cette augmentation d'activité de liaison à l'ADN à court terme après le stress pourrait faire d'AP1 et d'ATF-2 des facteurs de transcription potentiellement intéressants pour expliquer la surexpression de COX-2 chez les fibroblastes IMR-90 hTERT stressés (Figure III.7).



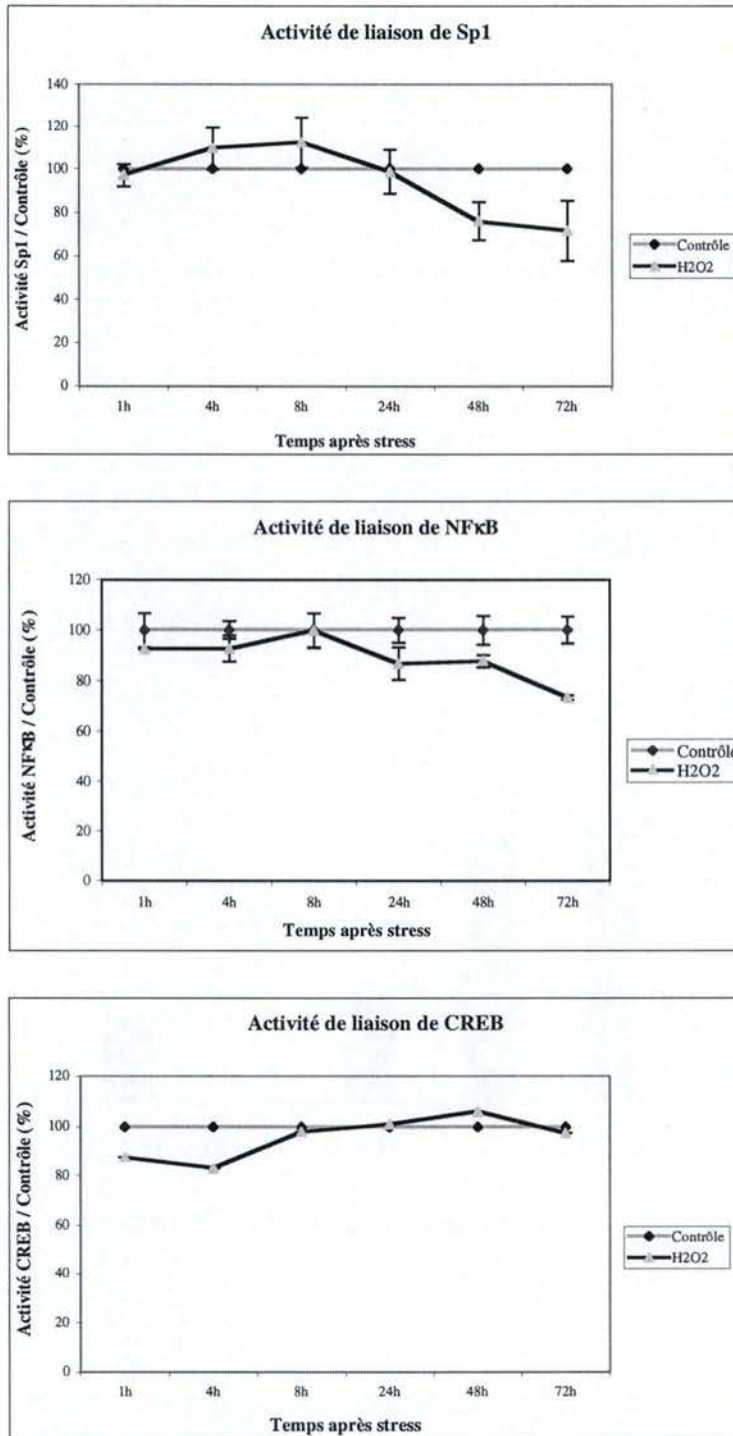
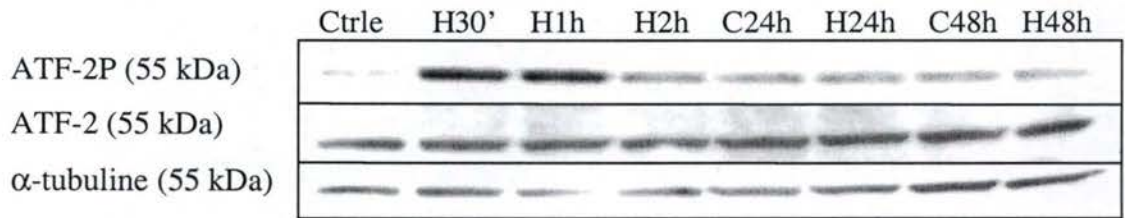


Figure III-7 : Evolution de l'activité de liaison à l'ADN des facteurs de transcription AP1, ATF-2, NFκB, SP1 et CREB, évaluée par dosage colorimétrique, chez des fibroblastes IMR-90 hTERT stressés sous 200 μM d'H₂O₂ durant 2 heures. Chaque point représente la moyenne +/- l'écart-type de 3 mesures réalisées à partir de 3 extraits nucléaires différents (à l'exception de CREB).

Ligne grise: Cellules contrôles non stressées

Ligne noire: Cellules stressées

A.



B.

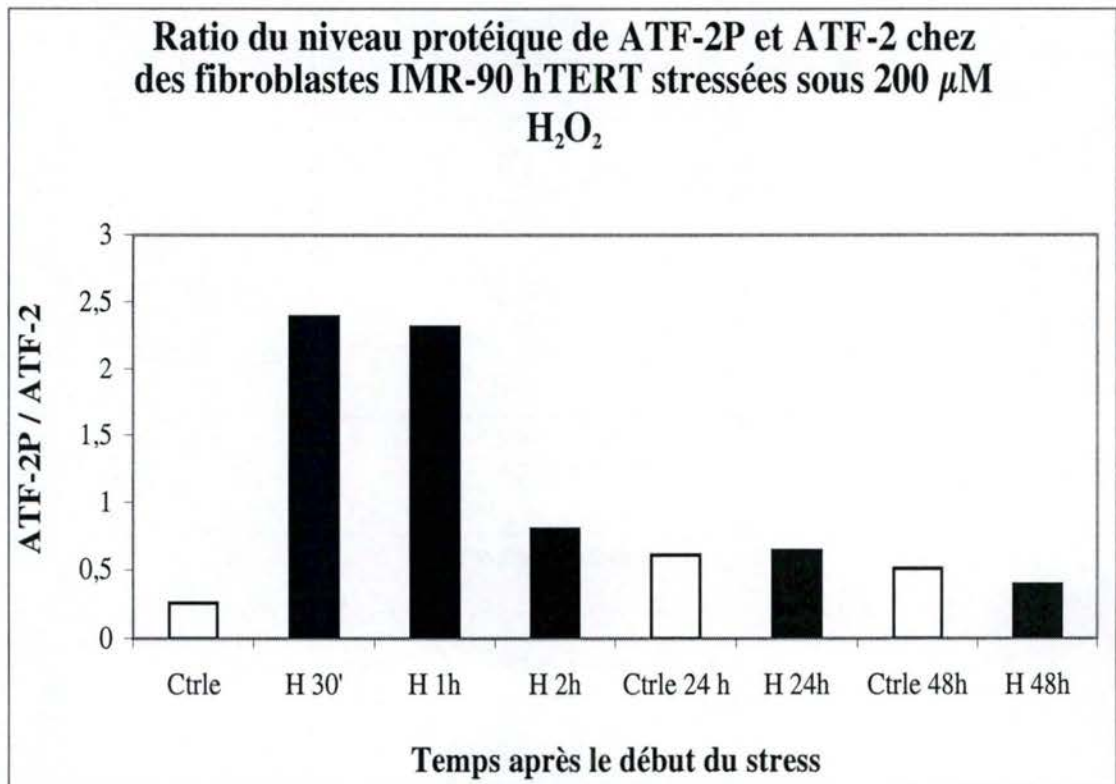


Figure III-8 :

A : Autoradiographies de différentes bandes obtenues par Western-blot à partir de 25 µg de protéines totales.

B : Rapport du niveau protéique d'ATF-2P et d'ATF-2 par Western-blot, chez des FHDs IMR-90 hTERT stressées sous 200 µM H₂O₂ durant 2 heures. Les résultats sont normalisés en utilisant l'α-tubuline comme référence.

Colonne blanche: Cellules contrôles non stressées.

Colonnes noires: Cellules stressées.

En ce qui concerne NF κ B, SP1 et CREB, aucune variation dans leur activité de liaison n'a été détectée, quelques soit les temps étudiés après le stress sous H₂O₂. NF κ B pourtant bien connu pour induire l'expression de COX-2 ne semble donc pas être responsable de la surexpression de COX-2 chez les fibroblastes IMR-90 hTERT en SIPS.

Sachant que le promoteur de COX-2 contient des sites de liaison à l'ADN où peuvent se fixer ATF-2 et AP1, et que ces facteurs voient leurs activités de liaison augmenter suite à un stress sous H₂O₂, nous avons voulu vérifier l'activation de ces deux facteurs dans notre modèle par la technique du Western-blot.

b) Etude de l'activation des facteurs de transcription AP1 et ATF-2

L'activité d'ATF-2 étant dépendante de sa phosphorylation, la forme phosphorylée d'ATF-2 a été détectée à différents temps après un stress subcytotoxique sous H₂O₂. Les valeurs obtenues ont été quantifiées par rapport à l' α -tubuline et la quantification correspondant à la forme phosphorylée fut rapportée à celle de la forme non phosphorylée. Le Western-blot présenté à la **figure III.8** nous indique que les cellules stressées voient leur niveau d'ATF-2 phosphorylé augmenter de l'ordre de 8 et 7,6 fois respectivement à 30 minutes et 1 heure après le stress. Cette augmentation semble ensuite s'atténuer 2 heures après le stress pour finalement disparaître à 24 et 48 heures après le stress. Ces résultats sont en concordance avec ceux obtenus lors de l'étude d'activité de liaison d'ATF-2 décrite ci-dessus.

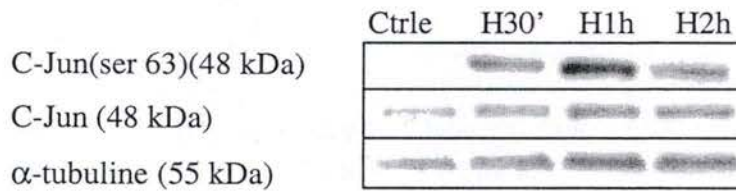
AP-1 est une protéine dimérique composée des sous unités FOS et JUN. Une activation de ce facteur de transcription peut être visualisée par une augmentation de l'abondance protéique de c-Fos, et de la forme phosphorylée de c-Jun au niveau des sérines en position 63 et 73. Les résultats de l'analyse protéique des formes phosphorylées de c-Jun ont, pour chacune d'entre elles, été rapportées aux résultats de c-Jun sous sa forme non phosphorylée. Les Western-blots présentés aux **figures III.9 et III.10** nous montrent que la forme phosphorylée de c-Jun est indétectable chez les cellules contrôles alors que les cellules stressées voient leur niveau de c-Jun phosphorylé fortement augmenté et ce, dès la première demi-heure après le stress sous H₂O₂. En ce qui concerne c-Fos, on observe également une légère augmentation de son abondance chez les cellules stressées par rapport aux cellules contrôles (**Figure III.11**). Ces résultats concernant c-Fos et c-Jun nous permettent de confirmer l'activation d'AP-1 suite à un stress subcytotoxique sous H₂O₂ chez des fibroblastes IMR-90 hTERT.

Etant donné que les facteurs de transcription AP1 et ATF-2 sont tous les deux activés suite à des phosphorylations, nous nous sommes focalisés sur l'implication possible des MAP Kinases dans leur activation. Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes tout particulièrement intéressés à p38^{MAPK}.

c) Etude de p38^{MAPK} dans la surexpression de COX-2

Frippiat a montré que suite à un stress sous H₂O₂, la protéine p38^{MAPK} est activée par phosphorylation et pénètre dans le noyau où elle active le facteur ATF-2 chez des fibroblastes IMR-90 (Frippiat *et al.*, 2001). Nous nous sommes donc logiquement tournés vers la voie de p38^{MAPK}. Nous avons tout d'abord étudié la phosphorylation de p38^{MAPK} à différents temps après un stress subcytotoxique sous H₂O₂. Nous avons ensuite étudié l'activation d'ATF-2 et la surexpression de COX-2 après un stress H₂O₂ en présence d'un inhibiteur spécifique de

A.



B.

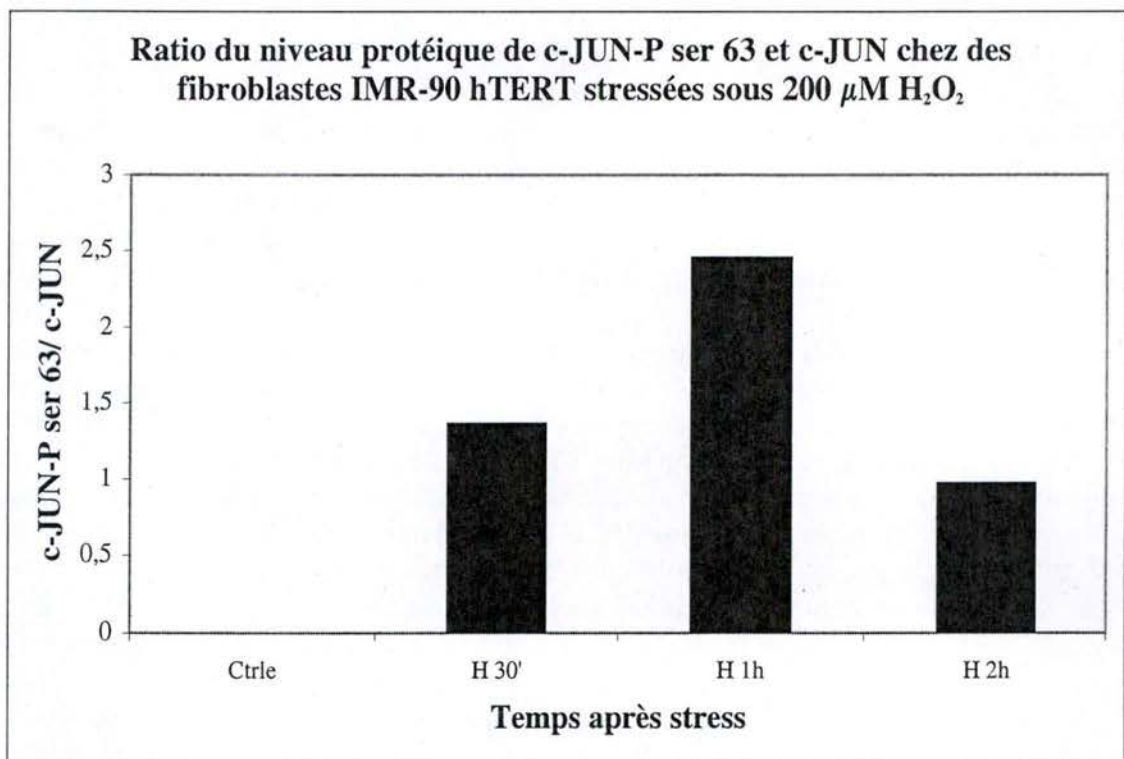


Figure III-9 :

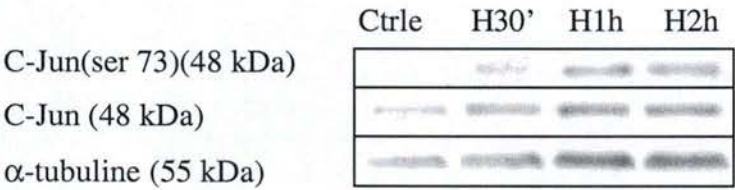
A : Autoradiographies de différentes bandes obtenues par Western-blot à partir de 25 μ g de protéines totales.

B : Analyse du niveau protéique de c-Jun et c-JunP(ser63) par Western-blot, chez des FHDs IMR-90 hTERT stressées sous 200 μ M H₂O₂ durant 2 heures. Les résultats sont normalisés en utilisant l' α -tubuline comme référence.

Colonne blanche: Cellules contrôles non stressées.

Colonnes noires: Cellules stressées.

A.



B.

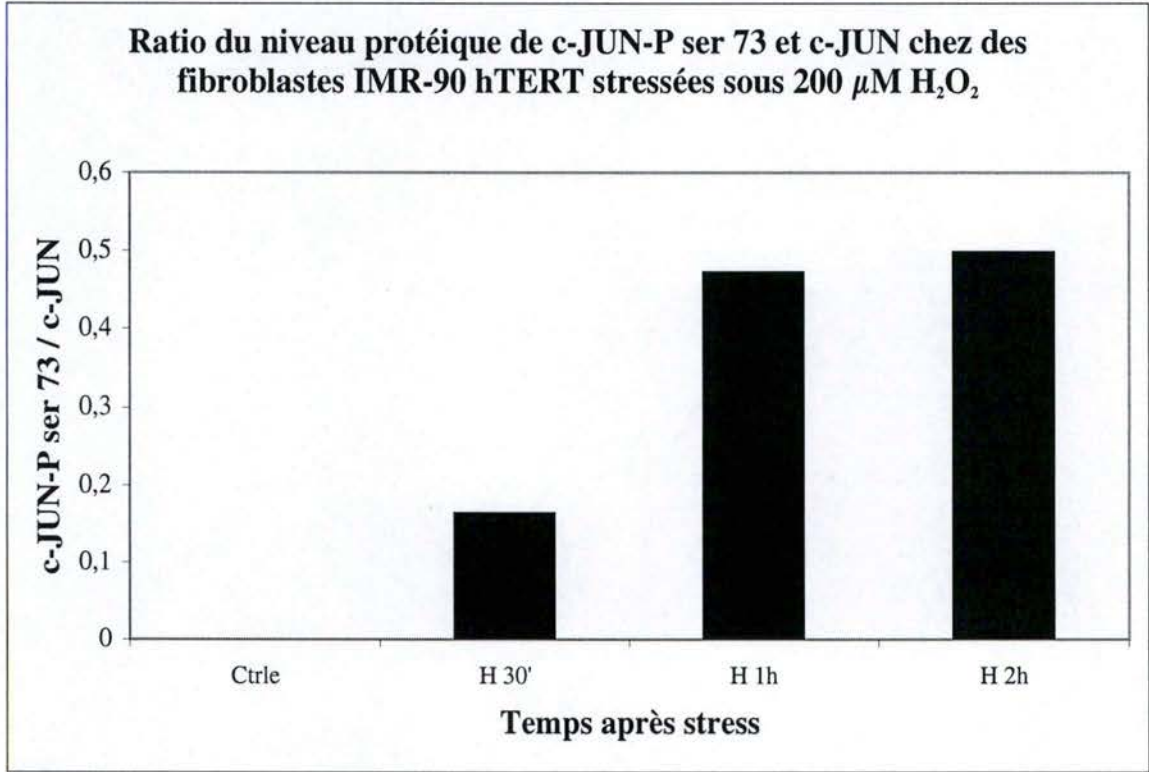


Figure III-10 :

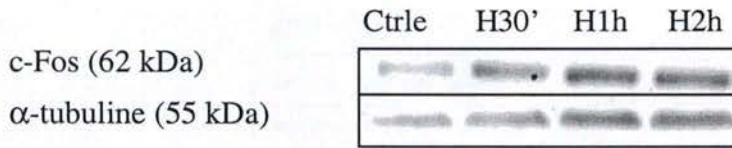
A : Autoradiographies de différentes bandes obtenues par Western-blot à partir de 25 μ g de protéines totales.

B : Analyse du niveau protéique de c-Jun et c-JunP(ser73) par Western-blot, chez des FHDs IMR-90 hTERT stressées sous 200 μ M H₂O₂ durant 2 heures. Les résultats sont normalisés en utilisant l' α -tubuline comme référence.

Colonne blanche: Cellules contrôles non stressées.

Colonnes noires: Cellules stressées.

A.



B.

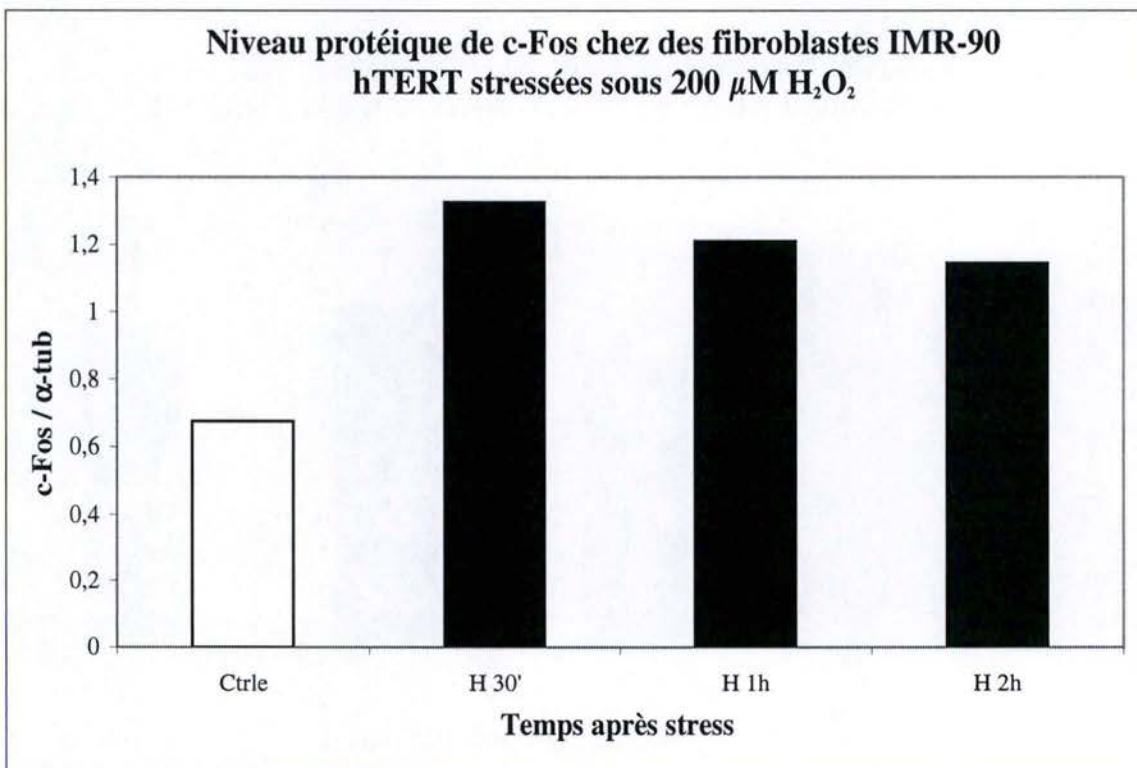


Figure III-11 :

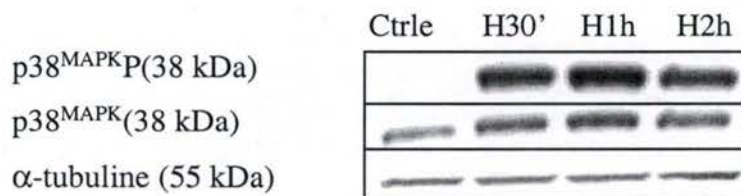
A : Autoradiographies de différentes bandes obtenues par Western-blot à partir de 25 μ g de protéines totales.

B : Analyse du niveau protéique de c-Fos par Western-blot, chez des FHDs IMR-90 hTERT stressées sous 200 μ M H_2O_2 durant 2 heures. Les résultats sont normalisés en utilisant l' α -tubuline comme référence.

Colonne blanche: Cellules contrôles non stressées.

Colonnes noires: Cellules stressées.

A.



B.

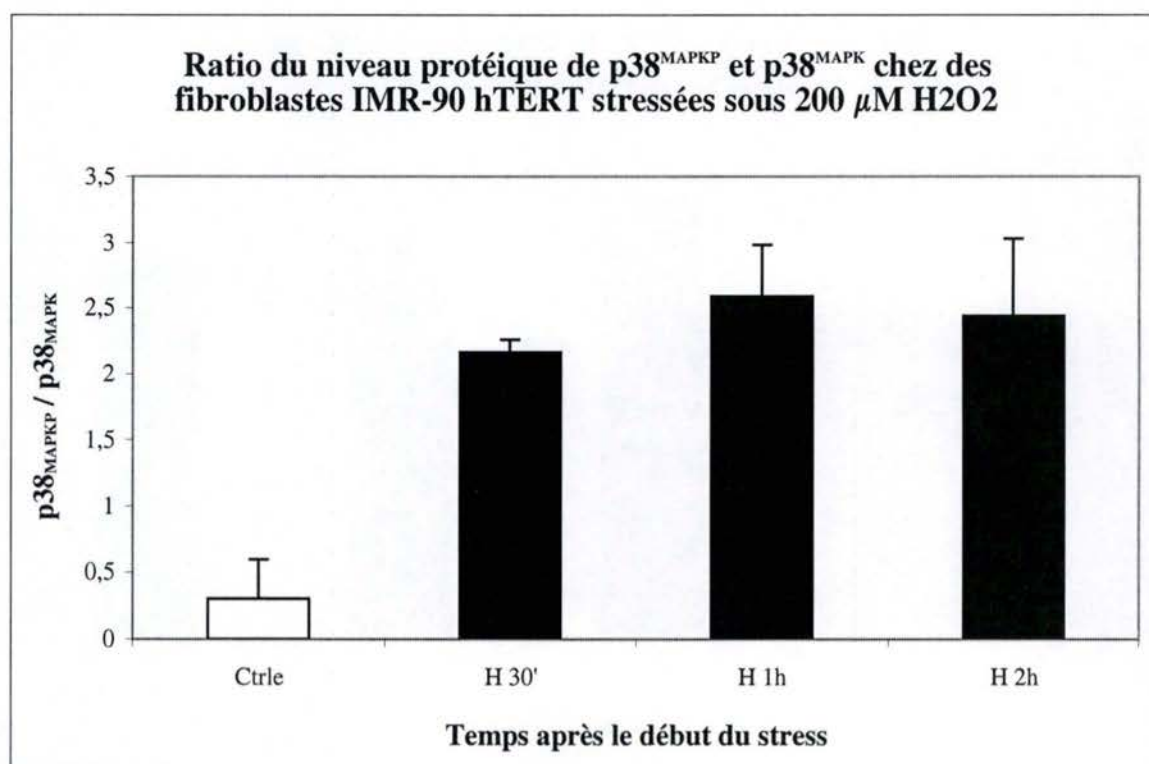


Figure III-12:

A : Autoradiographies de différentes bandes obtenues par Western-blot à partir de 25 μ g de protéines totales.

B : Ratio du niveau protéique de p38^{MAPK}P et de p38^{MAPK} par Western-blot, chez des FHDs IMR-90 hTERT stressés sous 200 μ M H₂O₂ durant 2 heures. Les résultats sont normalisés en utilisant l' α -tubuline comme référence.

Colonne blanche: Cellules contrôles non stressées.

Colonnes noires: Cellules stressées.

p38^{MAPK}. Cet inhibiteur, le SB203580, est un dérivé de pyridyl imidazole capable de se fixer au niveau du site de liaison à l'ATP de p38^{MAPK} empêchant, de cette manière, l'activité kinase de cette enzyme (Young *et al.*, 1997).

➤ Activation de p38^{MAPK} chez les fibroblastes IMR-90 hTERT en SIPS

L'activation de p38^{MAPK} fut vérifiée par Western Blot. Nous avons analysé l'abondance de la protéine p38^{MAPK} phosphorylée chez les IMR-90 hTERT à 30 minutes, 1 et 2 heures après le stress sous H₂O₂ par rapport à celle des cellules contrôles. Les résultats de l'analyse protéique de la forme phosphorylée de p38^{MAPK} ont été rapportés aux résultats de p38^{MAPK} non phosphorylé. On remarque une nette augmentation de la phosphorylation de p38^{MAPK} pour les trois temps étudiés après le stress (**Figure III.12**). Il semble donc que p38^{MAPK} soit active dans notre modèle de fibroblastes IMR-90 hTERT en SIPS sous H₂O₂.

➤ Rôle de p38^{MAPK} dans l'activation d'ATF-2 et la surexpression de COX-2

Afin de vérifier l'implication de p38^{MAPK} au niveau de l'activation d'ATF-2 et de la surexpression de COX-2 chez les fibroblastes IMR-90 hTERT en SIPS, nous avons utilisé un inhibiteur spécifique de la p38^{MAPK}, le SB203580. Nous avons donc placé les fibroblastes IMR-90 hTERT en présence du SB203580, 12 heures avant le stress, pendant et après le stress. Quatre conditions ont donc été analysées : des cellules contrôles n'ayant subi aucun traitement, des cellules non stressées mises en présence de SB203580, des cellules stressées sous 200 μ M d'H₂O₂ pendant deux heures et des cellules stressées en présence du SB203580.

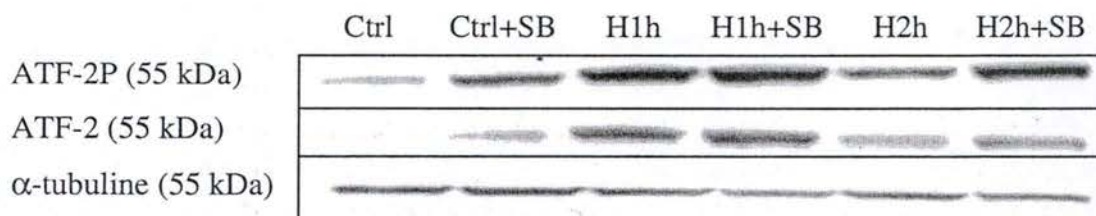
Effet de l'inhibition de p38^{MAPK} sur l'activation d'ATF-2

La p38^{MAPK} étant une des kinases capables d'activer ATF-2, nous avons étudié l'état de phosphorylation d'ATF-2 après un stress sous H₂O₂ en présence de l'inhibiteur de p38^{MAPK}, SB203580. Les résultats présentés à la **figure III.13** confirment le fait qu'ATF-2 soit activé suite à un stress H₂O₂ chez les fibroblastes IMR-90 hTERT. D'autre part, le fait d'inhiber la kinase p38^{MAPK} n'induit pas, comme espéré, une diminution de la phosphorylation d'ATF-2. Au contraire, une augmentation de son activation aussi bien chez les cellules contrôles que chez les cellules stressées est observée en présence de l'inhibiteur de p38^{MAPK}. Ce résultat est surprenant. Toutefois, nous savons que d'autres membres de la famille des MAPK peuvent être activés suite à un stress oxydatif. On peut dès lors penser que, suite à l'inhibition de p38^{MAPK}, d'autres kinases soient activées et interviennent dans l'activation d'ATF-2 suite à un stress sous H₂O₂. Dans le cadre de ce travail, il aurait été intéressant, d'une part, de mettre en évidence l'implication d'autres kinases dans notre modèle, et d'autre part, d'étudier le niveau d'activation d'AP-1 chez les cellules stressées et traitées avec l'inhibiteur de p38^{MAPK}. Par manque de temps, ceci n'a pu être réalisé.

Effet de l'inhibition de p38^{MAPK} sur la surexpression de la cyclooxygénase 2

Malgré le fait qu'ATF-2 était activé plutôt qu'inhibé chez les cellules stressées sous H₂O₂ en présence de l'inhibiteur de p38^{MAPK}, nous avons voulu savoir si p38^{MAPK} jouait un rôle au niveau de la surexpression de COX-2 chez les cellules stressées. Nous avons donc étudié le niveau protéique de COX-2 sous les différentes conditions représentées à la **figure III.14**. Comme nous l'avons montré précédemment, les cellules IMR-90 hTERT surexpriment la cyclooxygénase 2 24 heures après un stress sous H₂O₂. Lorsqu'on inhibe la protéine p38^{MAPK}, on observe une légère diminution du niveau protéique de COX-2 aussi bien chez les cellules

A.



B.

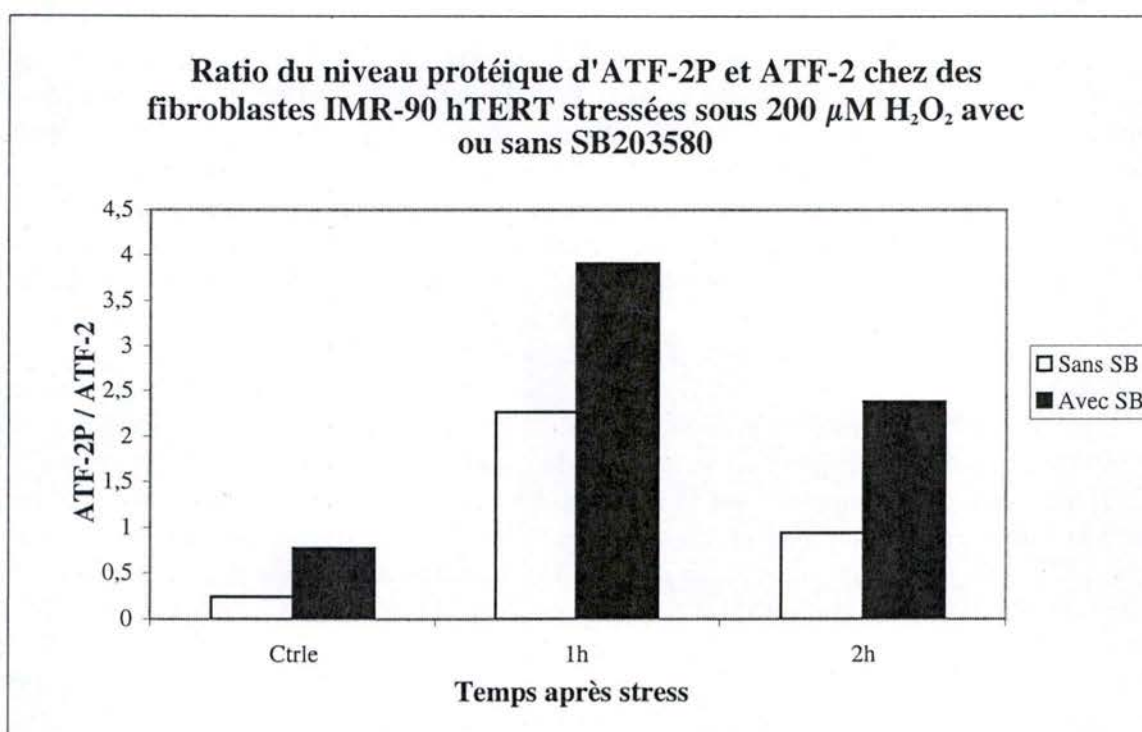


Figure III-13 :

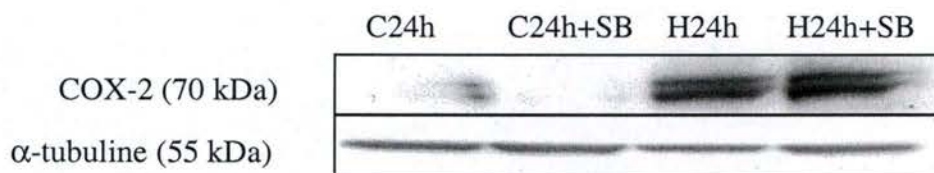
A : Autoradiographies de différentes bandes obtenues par Western-blot à partir de 25 μ g de protéines totales.

B : Analyse du niveau protéique d'ATF-2P et d'ATF-2 par Western-blot, chez des FHDs IMR-90 hTERT stressées sous 200 μ M H₂O₂ durant 2 heures ayant subi ou non l'inhibition de p38^{MAPK} par un traitement au SB203580. Les résultats sont normalisés en utilisant l' α -tubuline comme référence.

Colonne blanche: Cellules non traitées avec SB203580.

Colonnes noires: Cellules traitées avec SB203580.

A.



B.

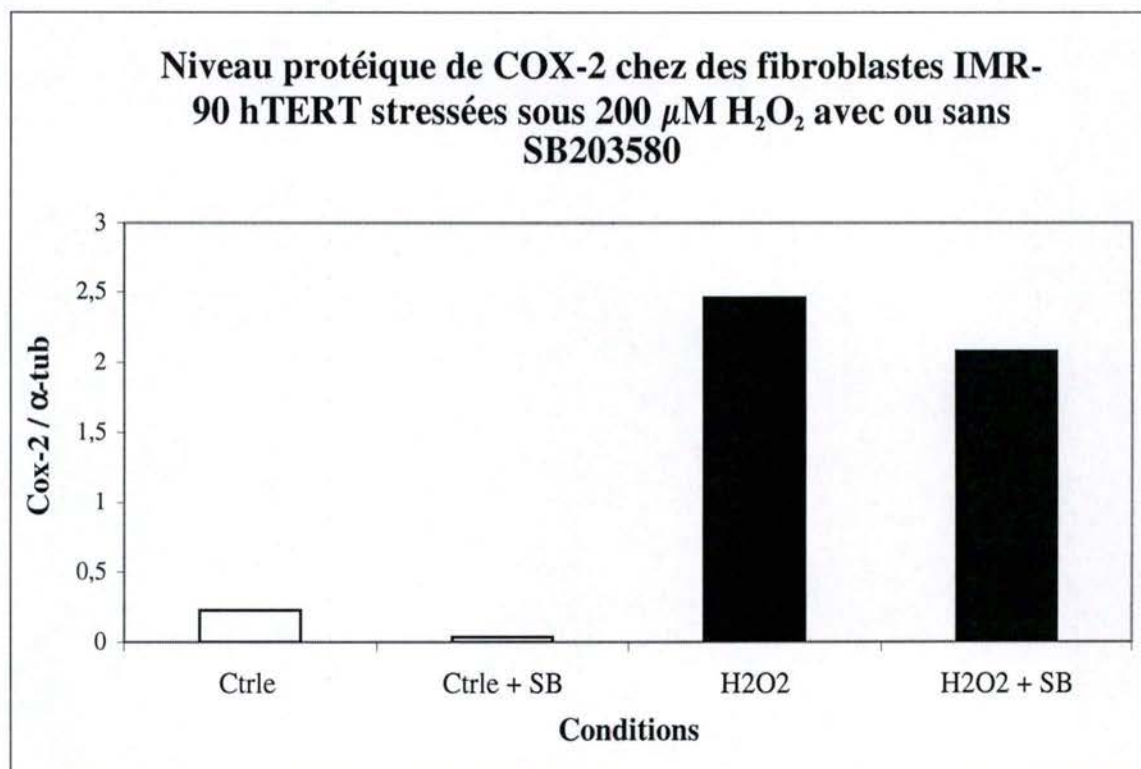


Figure III-14 :

A : Autoradiographies de différentes bandes obtenues par Western-blot à partir de 25 μ g de protéines totales.

B : Analyse du niveau protéique de COX-2 par Western-blot, 24 heures après que les cellules IMR-90 hTERT aient été stressées sous 200 μ M d'H₂O₂ en présence ou non de l'inhibiteur de p38^{MAPK}, SB203580. Les résultats sont normalisés en utilisant l' α -tubuline comme référence.

Colonnes blanches: Cellules contrôles non stressées.

Colonnes noires: Cellules stressées.

contrôles que chez les cellules stressées sous H_2O_2 . Cependant, la diminution observée chez les cellules stressées est insuffisante pour affirmer que $p38^{MAPK}$ soit, à elle seule, responsable de la surexpression de COX-2 (**Figure III.14**).

La COX-2 semble donc impliquée dans l'établissement de la SIPS, toutefois, elle ne l'explique certainement pas à elle seule. Afin de déterminer les implications possibles d'autres gènes, nous allons établir le profil d'expression génique à l'aide d'un damier à ADNc 72 heures après que des FDHs IMR-90 hTERT aient été stressés sous $200 \mu M$ d' H_2O_2 .

III. Etude d'expression génique différentielle

1. Damier à ADN

Afin d'étudier l'expression différentielle chez les fibroblastes IMR-90 hTERT, nous avons, 72 h après le stress sous $200 \mu M$ d' H_2O_2 , isolé l'ARN total de nos cellules. Ensuite, $10 \mu g$ d'ARN total ont été rétrotranscrits. Les ADN cibles ainsi obtenus, sont déposés sur chaque damier durant une nuit en vue de les hybrider avec leur trappeur anticomplémentaire. La révélation est effectuée grâce à un fluorochrome, la cyanine 3, couplé à un anticorps anti-biotine et par une analyse dans un scanner confocal. On obtient ainsi une image digitalisée des spots dont l'intensité est représentée par une échelle de couleurs artificielles. Chaque damier a été scanné à trois gains différents : 100, 70 et 50 afin de pouvoir détecter à la fois les transcrits respectivement présents en forte, moyenne et faible quantité (**Figure III.15**).

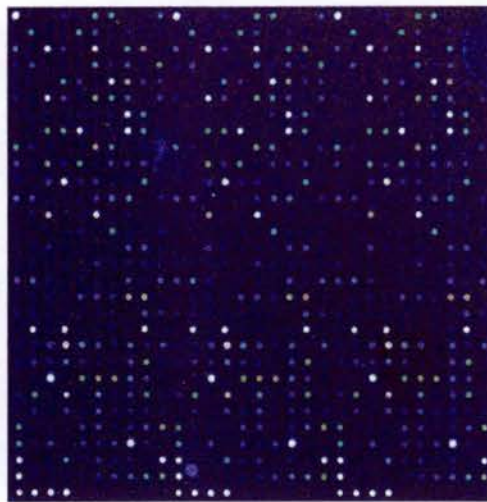
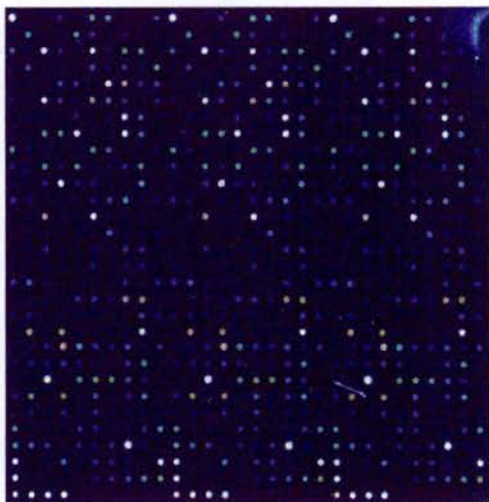
Les résultats obtenus après quantification et normalisation des résultats obtenus lors du scanning suggèrent que 72 h après le stress sous H_2O_2 , 38 transcrits sont présents en quantité différente par rapport aux cellules contrôles. Parmi ceux-ci, 31 connaissent une augmentation de leur niveau relatif d'ARNm alors que 7 autres voient une diminution de leur niveau relatif d'ARNm. Lors de l'analyse de nos résultats, nous avons classé les gènes étudiés selon leur fonction principale connue (**Figure III.16**)

Matrice extra-cellulaire

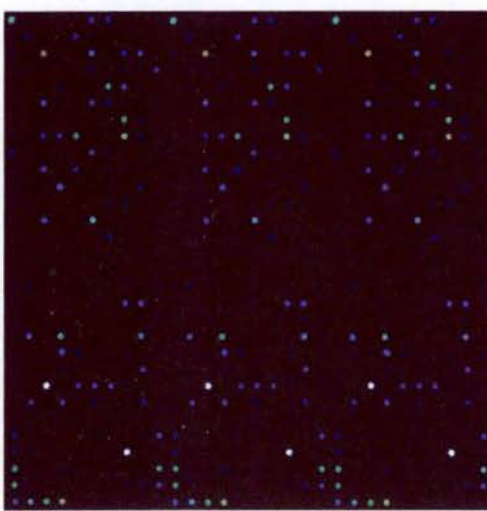
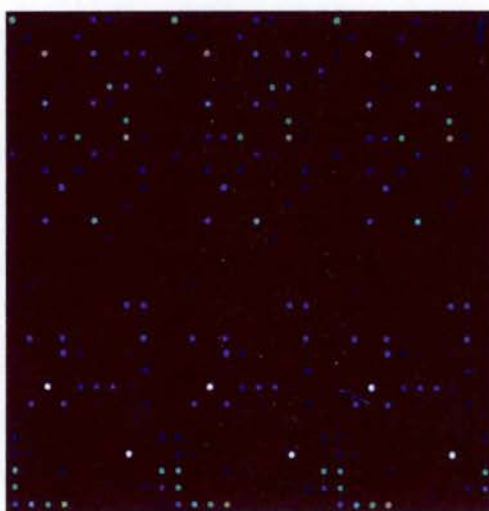
De nombreux gènes de la MEC voient leur niveau d'expression modifié lors de la sénescence réplivative. Dans notre étude, nous trouvons une répression de l' α -1 procollagène de type III (COL3A1) et l' α -2 procollagène de type VI (COL6A2). D'autre part, la fibronectine (FN1), l'ostéonectine (Oste), SM22 et la "Plasminogen activator inhibitor de type I (PAI-1), connus pour être surexprimés lors de la sénescence (Goldstein *et al*, 1994), voient leur niveau d'ARNm augmenté dans la SIPS induite sous H_2O_2 . La fibronectine est associée à diverses fonctions comprenant l'adhésion cellulaire, l'organisation du cytosquelette, la migration, la croissance et la différenciation cellulaire (Garcia *et al*, 1999). L'ostéonectine, quant à elle, contribue au remodelage des tissus en induisant l'expression de métalloprotéinases chez les FHDs. Tous ces résultats semblent nous montrer l'apparition de modifications au niveau de la constitution de la MEC suite à un stress sous H_2O_2 , tout comme c'est le cas en sénescence réplivative.

Outre ces gènes codant pour des constituants de la MEC, les gènes codant pour les métalloprotéinases 2 et 14 (MMP2 et MMP14) voient leur niveau relatif d'expression augmenter suite au stress. MMP2 est une gelatinase capable de dégrader divers composants de la MEC dont les gelatines, l'élastine, la fibronectine, les collagènes I, IV, V, VII, X, XI. MMP14, quant à elle, est une enzyme associée à la membrane plasmique et participe au mécanisme d'activation de la MMP2 (McCawley *et al*, 2001 ; Nagase *et al*, 1999). De plus,

Gain 100



Gain 70

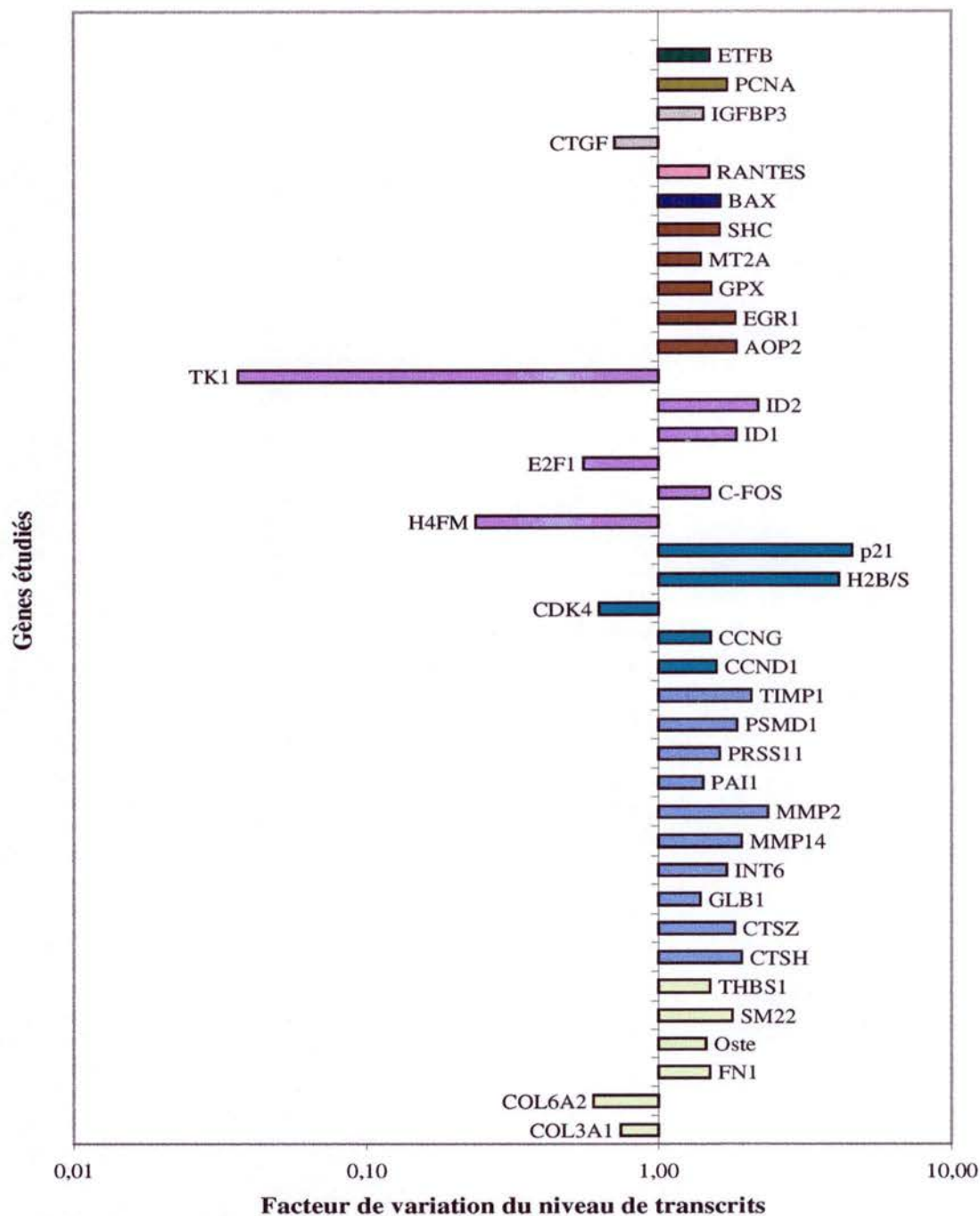


Gain 50



Figure III-15: Hybridation sur Senechips d'ADN complémentaire provenant de l'ARNm de fibroblastes IMR90 hTERT extrait 72h après stress H_2O_2

SIPS induite sous H₂O₂/ Contrôle (hTERT S1, 72h)



- Métabolisme énergétique
- Réparation /synthèse ADN
- Facteur de croissance
- Transduction du signal/ Récepteur
- Inflammation
- Stress
- Prolifération cellulaire
- Cycle cellulaire
- Dégardation/Synthèse protéines
- Morphologie et adhésion cellulaire

Figure III-16 : Liste des gènes dont le niveau d'ARNm varie chez les fibroblastes en SIPS induite sous H₂O₂. Les résultats ont été normalisés par des standards internes et des gènes de références ,et un ratio est calculé entre les cellules stressées et les cellules contrôles.

des métalloprotéinases sont connues pour être surexprimés en sénescence répliquative (pour une revue: (Campisi, 1999)). Si ces résultats sont confirmés au niveau protéique et activité biochimique, ils pourraient suggérer une profonde modification de la MEC, comparable à ce qui est observé en sénescence répliquative et lors du vieillissement *in vivo*.

Il est intéressant de constater que plusieurs gènes codant pour des enzymes lysosomiales tel que les cathepsines H et Z (CTSH et CTSZ) et la β -galactosidase (GIB1) voient leur niveau relatif d'ARNm augmenter après un stress sous H_2O_2 chez les FHDs IMR-90 hTERT. En ce qui concerne la β -galactosidase, sa surexpression peut être mise en relation avec la proportion augmentée de cellules positives pour la SA β -gal suite à la SIPS à l' H_2O_2 puisque la β -gal et la SA β -gal sont issues de ce même gène (Kurz *et al*, 2000).

Cycle cellulaire

En ce qui concerne les gènes impliqués dans le cycle cellulaire, nous observons que la CDK4 (cyclin dependent kinase), l'histone de type IV (H4FM), le facteur de transcription E2F-1, ainsi que la thymidine kinase (TK1) sont réprimés chez les fibroblastes IMR-90 hTERT soumis à un stress. Ces gènes, indispensables lors de la progression du cycle cellulaire, sont également réprimés chez les fibroblastes WI-38 sénescents (Cristofalo *et al*, 1998). Notons que le niveau relatif d'ARNm des cyclines G et D1 est sujet à une augmentation. Cette dernière est connue pour être surexprimée de 10 à 15 fois chez les cellules sénescents (Fukami *et al*, 1995). D'autre part, nous constatons une augmentation du niveau relatif d'ARNm de p21^{WAF-1}. Cette CDKI, capable d'inhiber l'activité du complexe CDK2/cycline E et par conséquent de bloquer le cycle cellulaire en fin de phase G1/S, est décrite comme étant un gène cible du facteur de transcription p53. Ce facteur, jouant un rôle majeur dans l'arrêt de la prolifération et l'apoptose, voit son expression fortement induite par des agents causant des dommages à l'ADN tel que les UV et les stress oxydatifs. Dans notre modèle de FHDs IMR-90 hTERT en SIPS sous H_2O_2 , nous n'avons pu mettre en évidence une surexpression de p53 par la technique du damier à ADN de faible densité. Enfin, c-Fos voit de manière assez surprenante, son niveau relatif d'ARN augmenter alors que son expression a été plusieurs fois décrite comme étant réprimée en sénescence répliquative (Seshadri and Campisi, 1990).

Réponse aux stress

Nous avons également constaté que la plupart des gènes intervenant dans le système de défense sont surexprimés suite à un stress. Parmi ceux-ci, on retrouve les gènes codant pour les protéines antioxydantes: la glutathion peroxydase (GPX), la protéine anti-oxydante 2 (AOP-2) et métallothionéine 2A (MT2A). Enfin, nous constatons que l'expression d'aucun gène pro ou anti-apoptotique, à l'exception de BAX, ne varie suite à un stress chez les FHDs IMR-90 hTERT. Selon Gorbunova, l'expression d'hTERT chez des FHDs IMR-90 protégerait ces cellules contre l'apoptose, mais n'empêcherait pas l'apparition de la SIPS. En effet, le processus de réparation dirigé par la télomérase (ajout de répétitions télomériques à la fin des chromosomes) serait capable de masquer partiellement les dommages à l'ADN à la machinerie apoptotique, mais serait toutefois incapable de réparer l'ADN et donc n'empêcherait pas les cellules d'entrer en SIPS (Gorbunova *et al*, 2002).

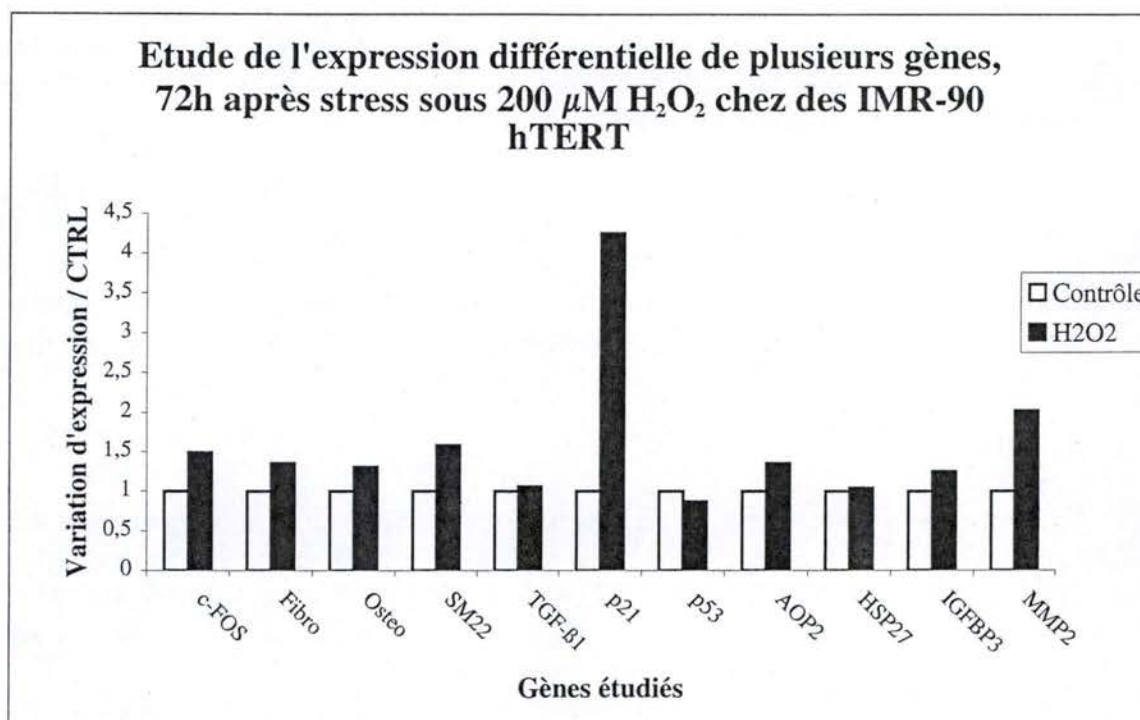


Figure III-17 : Etude par Real Time RT-PCR de l'expression différentielle associée à différents gènes suite à un stress sous 200 μ M H₂O₂. Cette étude fut réalisée à partir d'ARN total extrait 72 heures après le stress. Les résultats ont été normalisés par rapport aux gènes de la GAPDH et de RPL13.

Colonnes blanches: Cellules contrôles non stressées.

Colonnes noires: Cellules stressées.

	Damier	Real-time
c-FOS	1,5	1,49
Fibro	1,5	1,35
Osteo	1,45	1,30
SM22	1,79	1,58
TGF-β1	1,11	1,05
p21	4,58	4,25
p53	ND	0,87
AOP2	1,85	1,35
HSP27	1,07	1,04
IGFBP3	1,43	1,25
MMP2	2,37	2,02

Tableau III-1 : Tableau comparatif des résultats obtenus par Real Time RT-PCR et par l'hybridation sur Senechips concernant l'expression différentielle associée à différents gènes suite à un stress sous 200 μ M en H₂O₂ chez les fibroblastes IMR-90 hTERT.

Conclusion
et
Perspectives

2. Real Time RT-PCR

Afin de valider les résultats obtenus lors des hybridations sur damier de l'ADNc préalablement rétro-transcrits à partir d'ARNm issu de fibroblastes IMR-90 hTERT stressés sous H_2O_2 , nous avons décidé d'analyser le niveau relatif de 11 gènes par la méthode de PCR en temps réel en prenant comme niveau de référence la quantité d'ARNm de la glyceraldéhyde phosphate déshydrogénase (GAPDH) ainsi que du gène RPL13A codant pour la protéine ribosomale 23 kDa HBP dont le niveau d'expression ne change pas dans notre modèle. Parmi les 11 gènes choisis, les résultats obtenus pour 7 d'entre eux lors de l'utilisation du damier, présentent une augmentation de leur niveau relatif d'ARNm suite à un stress sous H_2O_2 en concordance avec les données de la littérature alors que les résultats obtenus pour c-Fos et TGF- β 1 sont assez surprenants. D'autre part, nous nous sommes intéressés au niveau d'expression de p53 qui n'a pu être analysé par la technique des damiers à ADN en raison de son faible taux de détection.

Les résultats représentés par la **Figure III.17**, nous indiquent que le niveau relatif de la fibronectine, l'ostéonectine, SM22, p21^{WAF-1}, et de la métalloprotéinase 2 (MMP2) est augmenté chez les cellules IMR-90 hTERT stressées. L'ensemble de ces résultats est en concordance avec ceux obtenus avec la technique du damier à ADN. Notons toutefois que les variations d'expression concernant les gènes AOP-2 et IGFBP3 observées par la technique de PCR en temps réel sont moins importantes que celles résultant de l'analyse du damier (**Tableau III.1**).

Il semblait également intéressant de vérifier les résultats correspondant au gène c-Fos et TGF- β 1. En effet, après l'analyse sur damier, on observe chez les fibroblastes IMR-90 hTERT stressés, une surexpression de c-fos alors que ce dernier est réprimé chez les cellules sénescents et en SIPS (Seshradi and Campisi, 1990). D'autre part, le niveau d'expression du TGF- β 1 ne varie pas alors que Frippiat et al. ont montré sa surexpression et son implication dans la mise en place de la SIPS induite sous H_2O_2 chez des FHDs IMR-90 (Frippiat *et al*, 2001). Les résultats obtenus pour c-Fos et TGF- β 1 par PCR en temps réel correspondent parfaitement à ceux issus des damiers à ADN.

La technique de PCR en temps réel a permis, contrairement à la technique des damiers à ADN, de mettre en évidence le niveau d'expression de p53. Dans notre modèle de FHDs IMR-90 hTERT en SIPS, nous constatons que p53 n'est pas surexprimé 72 h après un stress sous H_2O_2 . Ceci peut sembler surprenant vu que son expression est fortement induite par des agents causant des dommages à l'ADN et que la conséquence de cette activation est la transcription de plusieurs gènes cibles dont p21^{WAF-1}. Toutefois, il a été montré que le niveau protéique de p53 revient à son niveau basal dans les 44 h après exposition des fibroblastes IMR-90 à un stress subcytotoxique sous H_2O_2 alors que p21^{WAF-1} peut être surexprimé durant plusieurs semaines après le stress, gardant la protéine Rb sous sa forme hypophosphorylée (Chen *et al*, 1998). Ceci suggère l'intervention d'autres mécanismes permettant la surexpression de p21^{WAF-1} suite à un stress.

Les fibroblastes humains diploïdes en culture acquièrent, au cours des divisions cellulaires, divers biomarqueurs associés à la sénescence répllicative. Parmi ces biomarqueurs, on peut citer l'arrêt du cycle cellulaire, la morphologie cellulaire, le raccourcissement des télomères, l'activité β -galactosidase associée à la sénescence, l'altération du génome mitochondrial et la modification du niveau d'expression de certains gènes. De nombreuses études ont montré que ces fibroblastes exposés à des stress subcytotoxiques sous H_2O_2 , ethanol, UV ou *t*-BHP entrent en SIPS (sénescence induite prématurément par les stress). Cette dernière est caractérisée par des biomarqueurs communs à ceux associés à la sénescence répllicative.

Lors de ce mémoire, nous avons testé si les biomarqueurs de la SIPS apparaissaient chez les fibroblastes IMR-90 hTERT stressés sous H_2O_2 . Nous montrons une augmentation de cellules positives pour l'activité SA β -gal, une nette réduction du potentiel prolifératif ainsi qu'une augmentation du niveau protéique de p21^{WAF-1}, à 24, 48 et 72 heures après que les fibroblastes IMR-90 hTERT aient été soumis à un stress sous H_2O_2 pendant 2 heures. Ces résultats nous ont permis de confirmer la capacité des fibroblastes IMR-90 hTERT à rentrer en SIPS.

Nous nous sommes ensuite intéressés à la cyclooxygénase-2, une enzyme capable de synthétiser des prostaglandines et par conséquent, intervenant dans le processus inflammatoire (Copeland *et al.*, 1994). D'autre part, de récentes études ont mis en évidence un rôle anti-apoptotique et anti-prolifératif de cette enzyme (Tsuji *et al.*, 1995 ; Zahner *et al.*, 2002). Or, ces trois phénomènes sont largement étudiés chez les cellules en sénescence induite par les stress. En effet, les cellules en SIPS arrêtent de se diviser, sont résistantes à l'apoptose et sont caractérisées par un état pro-inflammatoire. C'est pour ces raisons que nous avons voulu savoir si COX-2 intervenait dans la mise en place de la SIPS chez les fibroblastes IMR-90 hTERT.

Des études au niveau transcriptomique et protéique ont permis de mettre en évidence la surexpression de la cyclooxygénase-2 lors de la SIPS chez les cellules IMR-90 hTERT. Ces résultats sont favorables pour une implication possible de l'intervention de COX-2 dans la mise en place de la SIPS. Cependant, d'autres expériences restent à réaliser. Il serait intéressant de vérifier l'activité de COX-2 dans notre modèle. Dans un premier temps, nous aimerions mettre en évidence le rôle de COX-2 dans l'établissement de la SIPS. Nous utiliserions un inhibiteur spécifique de COX-2 tel que l'indométhacine et étudierions, d'une part, l'impact de cet inhibiteur sur l'apparition des différents biomarqueurs de la SIPS et d'autre part les variations d'expression génique en relation avec l'expression de COX-2. Dans un second temps, on pourrait envisager de doser la production de prostaglandines libérées dans le milieu extracellulaire, chez les cellules en SIPS par rapport aux cellules contrôles, par la technique ELISA. Enfin, à plus long terme, nous pourrions transfecter l'ADNc de la COX-2 pour vérifier si sa surexpression peut à elle seule, provoquer l'apparition d'un phénotype sénescence et des différents biomarqueurs qui l'accompagne. Suite à cette transfection, il serait même envisageable de réaliser une étude sur les variations d'expression génique résultant d'une surexpression de Cox-2. Cette dernière étude pourrait, en effet, se faire via l'utilisation de la Senechips.

Nous nous sommes également intéressés aux voies de transduction du signal pouvant être responsables de la surexpression de COX-2. Dans ce contexte, nous nous sommes particulièrement attardés sur les facteurs de transcription AP1 et ATF-2 ainsi que sur la protéine p38^{MAPK}. Fripiat et al. a montré que suite à un stress sous H₂O₂, la protéine p38^{MAPK} était activée et transloquée dans le noyau où elle allait, à son tour, activer le facteur de transcription ATF-2 chez les fibroblastes IMR-90. Qui plus est, il a été montré que l'activation de p38^{MAPK} pouvait conduire à l'expression de COX-2 chez des kératinocytes stressés sous UV-B (Chen *et al.*, 2001). D'autre part, Adderley et son équipe ont montré que la MAP kinase ERK était activée chez des cardiomyocytes stressés sous H₂O₂ et que celle-ci était responsable de l'activation du facteur de transcription AP1, ce qui conduisait à la surexpression de la COX-2 (Adderley *et al.*, 1999). En outre, les facteurs de transcription AP1 et ATF-2 possèdent chacun un site de liaison au niveau du promoteur de COX-2.

Nous avons montré par une technique colorimétrique, que l'activité de liaison à l'ADN des facteurs de transcription AP1 et ATF-2 augmentait dans les premiers heures après un stress sous H₂O₂ chez les IMR-90 hTERT. De plus, une étude protéique par Western-blot a permis de mettre en évidence une nette augmentation de l'abondance des formes actives de ces deux facteurs de transcription chez les IMR-90 hTERT en SIPS. Ces résultats sont intéressants mais ne nous permettent pas d'affirmer que ces facteurs interviennent au niveau de la surexpression de COX-2. On pourrait, pour cela, transfecter des gènes rapporteur avec un promoteur de COX-2 de plus en plus petit. Il s'en suivrait une étude de l'abondance transcriptomique et protéique de COX-2 dans notre modèle de SIPS sous H₂O₂.

La p38^{MAPK} étant connue pour activer le facteur de transcription ATF-2 après un stress sous H₂O₂ et pour induire la surexpression de COX-2 par UV-B (Chen *et al.*, 2001), nous nous sommes demandés si elle intervenait dans la surexpression de COX-2 induite chez les fibroblastes IMR-90 hTERT en SIPS sous H₂O₂. Nous avons, tout d'abord, montré que p38^{MAPK} était activée suite au stress. Afin de vérifier si p38^{MAPK} était responsable de l'augmentation de l'activité d'ATF-2 et de la surexpression de COX-2, nous avons utilisé un inhibiteur spécifique de p38^{MAPK}. Les résultats de cette étude montrent que l'inhibition de p38^{MAPK} n'est pas suffisante pour empêcher la surexpression de COX-2 induite par les stress. De plus, il semble que cette inhibition ne permette pas de réduire l'activation d'ATF-2 chez les fibroblastes IMR-90 hTERT stressés. Il est probable cependant qu'ATF-2 soit activée par plusieurs kinases, et que l'inhibition d'une seule d'entre elle ne soit pas suffisante pour empêcher son action. Il serait intéressant dès lors, d'étudier l'activation d'autres MAPK dans notre modèle et de les inhiber afin de savoir si elles sont impliquées ou non au niveau de la surexpression de COX-2. La COX-2 semble donc impliquée dans l'établissement de la SIPS, toutefois, elle ne l'explique certainement pas à elle seule. Afin de déterminer les implications possibles d'autres gènes, nous allons établir le profil d'expression génique à l'aide d'un damier à ADN 72 heures après que des FDHs IMR-90 hTERT aient été stressés sous 200 µM d'H₂O₂.

Le damier à ADN "Senechips" constitue un outil analytique qui nous a permis de réaliser une étude semi quantitative sur plus de deux cent gènes à la fois, et donnant des résultats très reproductibles. Dans le cadre de ce mémoire, la Senechips nous a permis de

comparer les profils d'expressions de plus ou moins 40 gènes impliqués dans la prolifération, l'apoptose, les systèmes de défenses, la matrice extracellulaire, etc. Dès lors nous avons pu mettre en évidence une liste de différents gènes pour lesquels une variation d'expression génique était observée suite à la SIPS sous H_2O_2 . Une partie de ces variations ont ensuite été analysés en Real Time RT-PCR, ce qui a notamment contribué à la validation du modèle Senechips. Nous pourrions nous focaliser dans l'étude de quelques-uns de ces gènes afin de mettre en évidence le rôle de ceux-ci dans la SIPS. Nous pourrions aussi tenter de mettre en relation les variations de leurs expressions avec les variations d'activité d'ATF-2, AP1 ou d'autres facteurs de transcription, et déterminer ainsi les facteurs de transcription les plus impliqués dans l'apparition de la sénescence chez les IMR-90 hTERT.

Bibliographie

- Allsopp, R.C., Vaziri, H., Patterson, C., Goldstein, S., Younglai, E.V., Futcher, A.B., Greider, C.W. and Harley, C.B. (1992) Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 10114-10118.
- Angrand, P.O. (1993) Les domaines de liaison l'ADN des facteurs de transcription eucaryotes. *Médecine/Science*, **9**, 725-736.
- Atadja, P.W., Stringer, K.F. and Riabowol, K.T. (1994) Loss of serum response element-binding activity and hyperphosphorylation of serum response factor during cellular aging. *Mol Cell Biol*, **14**, 4991-4999.
- Bartek, J. and Lukas, J. (2001) Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage. *FEBS Lett*, **490**, 117-122.
- Bayreuther, K., Rodemann, H.P., Francz, P.I. and Maier, K. (1988a) Differentiation of fibroblast stem cells. *J Cell Sci Suppl*, **10**, 115-130.
- Bayreuther, K., Rodemann, H.P., Hommel, R., Dittmann, K., Albiez, M. and Francz, P.I. (1988b) Human skin fibroblasts in vitro differentiate along a terminal cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 5112-5116.
- Blackburn, E.H. (1991) Structure and function of telomeres. *Nature*, **350**, 569-573.
- Bodnar, A.G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S.E., Chiu, C.P., Morin, G.B., Harley, C.B., Shay, J.W., Lichtsteiner, S. and Wright, W.E. (1998) Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*, **279**, 349-352.
- Bourgain, F.M. and Katinka, M.D. (1991) Telomeres inhibit end to end fusion and enhance maintenance of linear DNA molecules injected into the Paramecium primaurelia macronucleus. *Nucleic Acids Res*, **19**, 1541-1547.
- Broccoli, D., Miller, O.J. and Miller, D.A. (1992) Isolation and characterization of a mouse subtelomeric sequence. *Chromosoma*, **101**, 442-447.
- Carrel, A. (1912) On the prmagant liveof tissues outside the organism, *J Exp Med*. **15**, 516.
- Cerni, C. (2000) Telomeres, telomerase, and myc. An update. *Mutat Res*, **462**, 31-47.
- Chong, L., van Steensel, B., Broccoli, D., Erdjument-Bromage, H., Hanish, J., Tempst, P. and de Lange, T. (1995) A human telomeric protein. *Science*, **270**, 1663-1667.
- Cong, F. and Goff, S.P. (1999) c-Abl-induced apoptosis, but not cell cycle arrest, requires mitogen-activated protein kinase kinase 6 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 13819-13824.
- Copeland, R.A., Williams, J.M., Giannaras, J., Nurnberg, S., Covington, M., Pinto, D., Pick, S. and Trzaskos, J.M. (1994) Mechanism of selective inhibition of the inducible isoform of prostaglandin G/H synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 11202-11206.
- Cristofalo, V.J., Volker, C., Francis, M.K. and Tresini, M. (1998) Age-dependent modifications of gene expression in human fibroblasts. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, **8**, 43-80.
- Dallaire, F., Dupuis, S., Fiset, S. and Chabot, B. (2000) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 and UP1 protect mammalian telomeric repeats and modulate telomere replication in vitro. *J Biol Chem*, **275**, 14509-14516.
- De Cesare, D., Fimia, G.M. and Sassone-Corsi, P. (1999) Signaling routes to CREM and CREB: plasticity in transcriptional activation. *Trends Biochem Sci*, **24**, 281-285.
- de Magalhaes, J.P., Chainiaux, F., Remacle, J. and Toussaint, O. (2002) Stress-induced premature senescence in BJ and hTERT-BJ1 human foreskin fibroblasts. *FEBS Lett*, **523**, 157-162.
- Dierick, J.F., Eliaers, F., Remacle, J., Raes, M., Fey, S.J., Larsen, P.M. and Toussaint, O. (2002) Stress-induced premature senescence and replicative senescence are different phenotypes, proteomic evidence. *Biochem Pharmacol*, **64**, 1011-1017.

- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O. and et al. (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 9363-9367.
- DuBois, R.N., Shao, J., Tsujii, M., Sheng, H. and Beauchamp, R.D. (1996) G1 delay in cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase-2. *Cancer Res*, **56**, 733-737.
- Dumont, P., Burton, M., Chen, Q.M., Gonos, E.S., Fripiat, C., Mazarati, J.B., Eliaers, F., Remacle, J. and Toussaint, O. (2000) Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast. *Free Radic Biol Med*, **28**, 361-373.
- Dumont, P., Chainiaux, F., Eliaers, F., Petropoulou, C., Remacle, J., Koch-Brandt, C., Gonos, E.S. and Toussaint, O. (2002) Overexpression of apolipoprotein J in human fibroblasts protects against cytotoxicity and premature senescence induced by ethanol and tert-butylhydroperoxide. *Cell Stress Chaperones*, **7**, 23-35.
- French, L.E., Chonn, A., Ducrest, D., Baumann, B., Belin, D., Wohlwend, A., Kiss, J.Z., Sappino, A.P., Tschopp, J. and Schifferli, J.A. (1993) Murine clusterin: molecular cloning and mRNA localization of a gene associated with epithelial differentiation processes during embryogenesis. *J Cell Biol*, **122**, 1119-1130.
- Fripiat, C., Dewelle, J., Remacle, J. and Toussaint, O. (2002) Signal transduction in H₂O₂-induced senescence-like phenotype in human diploid fibroblasts. *Free Radic Biol Med*, **33**, 1334-1346.
- Fukami, J., Anno, K., Ueda, K., Takahashi, T. and Ide, T. (1995) Enhanced expression of cyclin D1 in senescent human fibroblasts. *Mech Ageing Dev*, **81**, 139-157.
- Ghosh, S. and Karin, M. (2002) Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell*, **109 Suppl**, S81-96.
- Gilson, E., Laroche, T. and Gasser, S.M. (1993) Telomeres and the functional architecture of the nucleus. *Trends Cell Biol*, **3**, 128-134.
- Gonos, E.S., Derventzi, A., Kveiborg, M., Agiostratidou, G., Kassem, M., Clark, B.F., Jat, P.S. and Rattan, S.I. (1998) Cloning and identification of genes that associate with mammalian replicative senescence. *Exp Cell Res*, **240**, 66-74.
- Gorbunova, V., Seluanov, A. and Pereira-Smith, O.M. (2002) Expression of human telomerase (hTERT) does not prevent stress-induced senescence in normal human fibroblasts but protects the cells from stress-induced apoptosis and necrosis. *J Biol Chem*, **277**, 38540-38549.
- Greider, C.W. (1996) Telomere length regulation. *Annu Rev Biochem*, **65**, 337-365.
- Greider, C.W. and Blackburn, E.H. (1989) A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature*, **337**, 331-337.
- Greider, C.W. and Blackburn, E.H. (1996) Telomeres, telomerase and cancer. *Sci Am*, **274**, 92-97.
- Hanafusa, H., Ninomiya-Tsuji, J., Masuyama, N., Nishita, M., Fujisawa, J., Shibuya, H., Matsumoto, K. and Nishida, E. (1999) Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in transforming growth factor-beta-induced gene expression. *J Biol Chem*, **274**, 27161-27167.
- Harley, C.B., Futcher, A.B. and Greider, C.W. (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, **345**, 458-460.
- Hayflick, L. (1970) Aging under glass. *Exp. Gerontol*, **5**, 291-303.
- Hayflick, L. (1977) The cellular basis for biological aging. In Handbook of the biology of aging., C.E. Finch, Hayflick, L., ed. (New-York, Von Nostrand R.) pp. 159.
- Hayflick, L. and Moorhead, P.S. (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*, **25**, 585-621.

- Helenius, M., Hanninen, M., Lehtinen, S.K. and Salminen, A. (1996) Aging-induced up-regulation of nuclear binding activities of oxidative stress responsive NF-kB transcription factor in mouse cardiac muscle. *J Mol Cell Cardiol*, **28**, 487-498.
- Holt, S.E. and Shay, J.W. (1999) Role of telomerase in cellular proliferation and cancer. *J Cell Physiol*, **180**, 10-18.
- Jackson, S.P. (1992) Regulating transcription factor activity by phosphorylation. *Trends Cell Biol*, **2**, 104-108.
- Jiang, X.R., Jimenez, G., Chang, E., Frolkis, M., Kusler, B., Sage, M., Beeche, M., Bodnar, A.G., Wahl, G.M., Tlsty, T.D. and Chiu, C.P. (1999) Telomerase expression in human somatic cells does not induce changes associated with a transformed phenotype. *Nat Genet*, **21**, 111-114.
- Karin, M., Liu, Z. and Zandi, E. (1997) AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 240-246.
- Kurz, D.J., Decary, S., Hong, Y. and Erusalimsky, J.D. (2000) Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci*, **113** (Pt 20), 3613-3622.
- Lees-Miller, J.P., Heeley, D.H., Smillie, L.B. and Kay, C.M. (1987) Isolation and characterization of an abundant and novel 22-kDa protein (SM22) from chicken gizzard smooth muscle. *J Biol Chem*, **262**, 2988-2993.
- Lezza, A.M., Boffoli, D., Scacco, S., Cantatore, P. and Gadaleta, M.N. (1994) Correlation between mitochondrial DNA 4977-bp deletion and respiratory chain enzyme activities in aging human skeletal muscles. *Biochem Biophys Res Commun*, **205**, 772-779.
- Lindvall, C., Hou, M., Komurasaki, T., Zheng, C., Henriksson, M., Sedivy, J.M., Bjorkholm, M., Teh, B.T., Nordenskjold, M. and Xu, D. (2003) Molecular characterization of human telomerase reverse transcriptase-immortalized human fibroblasts by gene expression profiling: activation of the epiregulin gene. *Cancer Res*, **63**, 1743-1747.
- Martin, G.M., Sprague, C.A. and Epstein, C.J. (1970) replicative lifespan of cultured human cells: effect of donor age, tissues and genotype. *Lab Invest*, **23**, 86-92.
- Meyne, J., Ratliff, R.L. and Moyzis, R.K. (1989) Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 7049-7053.
- Michikawa, Y., Mazzucchelli, F., Bresolin, N., Scarlato, G. and Attardi, G. (1999) Aging-dependent large accumulation of point mutations in the human mtDNA control region for replication. *Science*, **286**, 774-779.
- Morin, G.B. (1989) The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell*, **59**, 521-529.
- Nakao, S., Ogtata, Y., Shimizu, E., Yamazaki, M., Furuyama, S. and Sugiya, H. (2002) Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)-induced prostaglandin E2 release is mediated by the activation of cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription via NFkappaB in human gingival fibroblasts. *Mol Cell Biochem*, **238**, 11-18.
- Pardee, A.B. (1974) A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **71**, 1286-1290.
- Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, **29**, e45.
- Pichler, R.H., Bassuk, J.A., Hugo, C., Reed, M.J., Eng, E., Gordon, K.L., Pippin, J., Alpers, C.E., Couser, W.G., Sage, E.H. and Johnson, R.J. (1996) SPARC is expressed by mesangial cells in experimental mesangial proliferative nephritis and inhibits platelet-derived-growth-factor-mediated mesangial cell proliferation in vitro. *Am J Pathol*, **148**, 1153-1167.
- Raz, A., Wyche, A., Siegel, N. and Needleman, P. (1988) Regulation of fibroblast cyclooxygenase synthesis by interleukin-1. *J Biol Chem*, **263**, 3022-3028.

- Renard, P., Ernest, I., Houbion, A., Art, M., Le Calvez, H., Raes, M. and Remacle, J. (2001) Development of a sensitive multi-well colorimetric assay for active NFkappaB. *Nucleic Acids Res*, **29**, E21.
- Ristimäki, A., Garfinkel, S., Wessendorf, J., Maciag, T. and Hla, T. (1994) Induction of cyclooxygenase-2 by interleukin-1 alpha. Evidence for post-transcriptional regulation. *J Biol Chem*, **269**, 11769-11775.
- Saretzki, G., Sitte, N., Merkel, U., Wurm, R.E. and von Zglinicki, T. (1999) Telomere shortening triggers a p53-dependent cell cycle arrest via accumulation of G-rich single stranded DNA fragments. *Oncogene*, **18**, 5148-5158.
- Semenza, G.L. (2000) HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol*, **88**, 1474-1480.
- Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D. and Lowe, S.W. (1997) Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*, **88**, 593-602.
- Sheng, H., Shao, J., Kirkland, S.C., Isakson, P., Coffey, R.J., Morrow, J., Beauchamp, R.D. and DuBois, R.N. (1997) Inhibition of human colon cancer cell growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2. *J Clin Invest*, **99**, 2254-2259.
- Spencer, A.G., Woods, J.W., Arakawa, T., Singer, II and Smith, W.L. (1998) Subcellular localization of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by immunoelectron microscopy. *J Biol Chem*, **273**, 9886-9893.
- Tesco, G., Vergelli, M., Grassilli, E., Salomoni, P., Bellesia, E., Sikora, E., Radziszewska, E., Barbieri, D., Latorraca, S., Fagiolo, U., Santacaterina, S., Amaducci, L., Tiozzo, R., Franceschi, C. and Sorbi, S. (1998) Growth properties and growth factor responsiveness in skin fibroblasts from centenarians. *Biochem Biophys Res Commun*, **244**, 912-916.
- Toussaint, O., Dumont, P., Dierick, J.F., Pascal, T., Fripiat, C., Chainiaux, F., Sluse, F., Eliaers, F. and Remacle, J. (2000a) Stress-induced premature senescence. Essence of life, evolution, stress, and aging. *Ann N Y Acad Sci*, **908**, 85-98.
- Toussaint, O., Houbion, A. and Remacle, J. (1992) Aging as a multi-step process characterized by a lowering of entropy production leading the cell to a sequence of defined stages. II. Testing some predictions on aging human fibroblasts in culture. *Mech Ageing Dev*, **65**, 65-83.
- Toussaint, O., Medrano, E.E. and von Zglinicki, T. (2000b) Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp Gerontol*, **35**, 927-945.
- Toussaint, O., Raes, M. and Remacle, J. (1991) Aging as a multi-step process characterized by a lowering of entropy production leading the cell to a sequence of defined stages. *Mech Ageing Dev*, **61**, 45-64.
- Toussaint, O., Remacle, J., Dierick, J.F., Pascal, T., Fripiat, C., Royer, V. and Chainiaux, F. (2002a) Approach of evolutionary theories of ageing, stress, senescence-like phenotypes, calorie restriction and hormesis from the view point of far-from-equilibrium thermodynamics. *Mech Ageing Dev*, **123**, 937-946.
- Toussaint, O., Royer, V., Salmon, M. and Remacle, J. (2002b) Stress-induced premature senescence and tissue ageing. *Biochem Pharmacol*, **64**, 1007-1009.
- Tsujii, M. and DuBois, R.N. (1995) Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell*, **83**, 493-501.
- Urquidí, V., Tarín, D. and Goodison, S. (2000) Role of telomerase in cell senescence and oncogenesis. *Annu Rev Med*, **51**, 65-79.

- Vaziri, H., Dragowska, W., Allsopp, R.C., Thomas, T.E., Harley, C.B. and Lansdorp, P.M. (1994) Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 9857-9860.
- Watson, J.D. (1994) ADN recombinant-2nd ed. *De Boeck Université*, **164**.
- Wolowiec, D., Mekki, Y., Ffrench, P., Manel, A.M., Bertrand, Y., Rimokh, R., Philippe, N., Bryon, P.A. and Ffrench, M. (1996) Differential expression of cell proliferation regulatory proteins in B- and T-lineage acute lymphoblastic leukaemias. *Br J Haematol*, **95**, 518-523.
- Yan, X., Wu Xiao, C., Sun, M., Tsang, B.K. and Gibb, W. (2002) Nuclear factor kappa B activation and regulation of cyclooxygenase type-2 expression in human amnion mesenchymal cells by interleukin-1beta. *Biol Reprod*, **66**, 1667-1671.
- Young, P.R., McLaughlin, M.M., Kumar, S., Kassis, S., Doyle, M.L., McNulty, D., Gallagher, T.F., Fisher, S., McDonnell, P.C., Carr, S.A., Huddleston, M.J., Seibel, G., Porter, T.G., Livi, G.P., Adams, J.L. and Lee, J.C. (1997) Pyridinyl imidazole inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase bind in the ATP site. *J Biol Chem*, **272**, 12116-12121.
- Yu, G.L., Bradley, J.D., Attardi, L.D. and Blackburn, E.H. (1990) In vivo alteration of telomere sequences and senescence caused by mutated Tetrahymena telomerase RNAs. *Nature*, **344**, 126-132.
- Zahner, G., Wolf, G., Ayoub, M., Reinking, R., Panzer, U., Shankland, S.J. and Stahl, R.A. (2002) Cyclooxygenase-2 overexpression inhibits platelet-derived growth factor-induced mesangial cell proliferation through induction of the tumor suppressor gene p53 and the cyclin-dependent kinase inhibitors p21waf-1/cip-1 and p27kip-1. *J Biol Chem*, **277**, 9763-9771.
- Zakeri, Z., Curto, M., Hoover, D., Wightman, K., Engelhardt, J., Smith, F.F., Kierszenbaum, A.L., Gleeson, T. and Tenniswood, M. (1992) Developmental expression of the S35-S45/SGP-2/TRPM-2 gene in rat testis and epididymis. *Mol Reprod Dev*, **33**, 373-384.

16 JUIN 2004

SECRETARIAT BIOLOGIE
F.U.N.D.P.
Rue de Bruxelles, 59
B 5000 NAMUR (Belgique)
Tél. 081 / 72 44 18 - Fax 081 / 72 44 20

X



20.044.485

